



HAL
open science

TgREMIND est essentiel pour la biogénèse des organites sécrétoires de *Toxoplasma gondii* et pour l'infection de l'hôte

Rodrigue Houngue

► To cite this version:

Rodrigue Houngue. TgREMIND est essentiel pour la biogénèse des organites sécrétoires de *Toxoplasma gondii* et pour l'infection de l'hôte. Biologie cellulaire. Université Paris-Saclay; Université d'Abomey-Calavi (Bénin), 2023. Français. NNT : 2023UPASL029 . tel-04072013

HAL Id: tel-04072013

<https://theses.hal.science/tel-04072013>

Submitted on 17 Apr 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.

TgREMIND est essentiel pour la biogénèse des organites sécrétoires de *Toxoplasma gondii* et pour l'infection de l'hôte

Toxoplasma TgREMIND is essential for secretory organelle biogenesis and host infection

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 de la santé
Réfèrent : Faculté des Sciences d'Orsay
Et École Doctorale Sciences de la Vie et de la Terre (EDSVT)
Université d'Abomey-Calavi

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 **Stanislas TOMAVO**, Directeur de recherche au CNRS, et sous la direction de **Lucie AYI-FANOU**, Professeure du CAMES

Thèse soutenue à Cotonou, le 31 Mars 2023, par

Rodrigue HOUNGUE

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Akadiri YESSOUFOU Professeur, Université d'Abomey-Calavi	Président
Lamine BABA-MOUSSA Professeur, Université d'Abomey-Calavi	Rapporteur & Examineur
Catherine Laure TOMASETTO Directrice de recherche, Université de Strasbourg	Rapporteuse & Examinatrice
Sylviane PIED Directrice de recherche, Université de Lille	Rapporteuse & Examinatrice
Guy TRAN VAN NHIEU Directeur de recherche, Université Paris-Saclay	Examineur
Maximin SENOU Maître de Conférences, Université Nationale des Sciences, Technologies, Ingénierie et Mathématiques	Examineur

Titre : TgREMIND est essentiel pour la biogénèse des organites sécrétoires de *Toxoplasma gondii* et pour l'infection de l'hôte

Mots clés : *Toxoplasma gondii*, TgREMIND, TgSTART, granules denses, rhoptries, phosphatidylinositol, lipides des membranes

Résumé : *Toxoplasma gondii* est membre des parasites *Apicomplexa* qui sont caractérisés non seulement par un développement intracellulaire obligatoire, mais aussi par trois organites sécrétoires spécifiques à savoir les micronèmes, rhoptries et les granules denses. Pendant que certains parasites *Apicomplexa* sont capables d'infecter soit uniquement les animaux ou les humains, *Toxoplasma gondii* infecte à la fois les animaux et les humains en causant la toxoplasmose. Tout comme les autres parasites *Apicomplexa* (*Plasmodium SP*, *Cryptosporidium SP*...) la virulence et la survie intracellulaire de *T. gondii* dépendent des facteurs de virulence MICs, ROPs/ROns et GRAs que renferment respectivement les micronèmes, les rhoptries et les granules denses. Le trafic des facteurs pour la biogénèse des organites du parasite ainsi que leur sécrétion lors de l'invasion dépendent d'autres facteurs indispensables dont TgVPS35 et TgSORT qui sont partenaires l'une de l'autre et qui ont permis d'identifier TgREMIND (*T. gondii* REgulator of Membrane Interacting Domain) qui a fait l'objet de ma thèse. Le but principal de cette thèse était d'élucider les fonctions biologiques de la protéine TgREMIND dans le trafic intracellulaire et la biogénèse des organites sécrétoires spécifiques chez *T. gondii*. Nous avons dans un premier temps montré par bio-informatique que TgREMIND possède un premier domaine F-BAR connu pour fixer les membranes en induisant la formation de vésicules et un second domaine original de fonctions inconnues que nous avons appelé REMIND (*Regulator of Membrane Interacting Domain*). Ce domaine a donc donné le nom de la protéine entière TgREMIND. Nous avons montré par la suite grâce aux tests de *Lipid Overlay* que TgREMIND fixe plusieurs phosphoinositols (PIP2) confirmant ainsi l'interaction prédite de TgREMIND avec la membrane. Nous avons aussi identifié par GST-pull down les partenaires de TgREMIND, comme certains facteurs du trafic (TgVPS35, TgSORT, SECs etc...), certains facteurs lipidiques (START domain containing protein et des phosphatidylinositols kinases) et des protéines

des granules denses et celles des rhoptries qui sont majoritaires de toutes les partenaires. Par ailleurs, en testant l'anticorps anti TgREMIND sur les parasites sauvages, nous avons d'abord identifié en microscopie confocale le signal de TgREMIND qui est un signal ponctiforme cytoplasmique dans différents compartiments subcellulaires y compris les compartiments golgiens et post-golgiens, endosomal et à l'extrémité apical du parasite donc à proximité des rhoptries. Nous avons déterminé par western blots que la taille native est d'environ 140 kDa de TgREMIND. Ensuite, nous avons créé un mutant knock-out inductible de TgREMIND à partir duquel nous avons montré qu'en absence de TgREMIND chez le mutant, qu'il y a des changements morphologiques des rhoptries, disparition des granules denses et absence de la sécrétion de leur contenu. Cela a affecté sévèrement la motilité des parasites, ce qui a pour conséquence une incapacité sévère des parasites à envahir les cellules de mammifères pour provoquer une infection toxoplasmique. Les différents défauts ont été corrigés par complémentation du mutant TgREMIND. Nous avons ainsi conclu que la protéine TgREMIND est probablement impliquée dans la formation de la membrane vésiculaire requise pour la biogénèse des organites sécrétoires spécifiques de *T. gondii*. La deuxième partie de ma thèse était portée sur la protéine TgSTART, partenaire lipidique de TgREMIND. Nous avons caractérisé TgSTART à partir des parasites transgéniques et du mutant Knockdown du gène TgSTART taggués avec l'épitope HA.

Title : *Toxoplasma* TgREMIND is essential for secretory organelle biogenesis and host infection

Keywords : *Toxoplasma gondii*, TgREMIND, TgSTART, dense granules, rhoptries, inositol phospholipids, lipid of membrane

Abstract : *Toxoplasma gondii* is a member of *Apicomplexa* phylum, which is characterized by the presence of three parasite's specific secretory organelles named micronemes, rhoptries and dense granules. While some *Apicomplexa* parasites can infect either only animals or humans cells, *Toxoplasma gondii* infects both animals and humans to induce toxoplasmosis. Like other *Apicomplexa* parasites such as *Plasmodium SP*, *Cryptosporidium SP...*, the virulence and intracellular survival of *T. gondii* depend on the MICs, ROPs/RONs and GRAs proteins that are the virulence factors contained in micronemes, rhoptries and dense granules respectively. The trafficking of these factors for the biogenesis of the parasite organelles as well as their secretion during invasion depend on other essential factors such as TgVPS35 and TgSORT which are partners of each other and which allowed to identify TgREMIND (*T. gondii* REgulator of Membrane Interacting Domain) which is the project of my thesis. The goal of this thesis is to elucidate the biological functions of the TgREMIND protein in intracellular trafficking and biogenesis of specific secretory organelles in *T. gondii*. We first showed by bioinformatics that TgREMIND has a N-terminus F-BAR domain known to bind membranes by inducing vesicle formation and a novel C-terminus domain that we named REMIND for Regulator of Membrane Interacting Domain. We subsequently showed by Lipid Overlay assay that TgREMIND binds several phosphatidylinositol phosphate (PIP2 species). These data confirm the predicted interaction of TgREMIND with the membrane. We also identified by GST-pull down TgREMIND partners, such as some trafficking factors like TgVPS35, TgSORT, SECs etc..., some lipid factors as START domain containing protein and phosphatidylinositol kinases, and dense granules proteins and rhoptries proteins, which are in the majority of all partners.

Moreover, by testing the anti-TgREMIND antibody on wild type parasites, we first identified by confocal microscopy the signal of TgREMIND which is localized as punctated signals in the cytoplasm of the parasites and includes the golgi and post-golgi compartments, endosomal and at the apical end where rhoptries are located. Then we determined by western blot, TgREMIND native size that is about 140 kDa. Moreover, we created an inducible knock-out mutant of TgREMIND and showed that in the absence of TgREMIND protein, there are morphological changes of the rhoptries, disappearance of dense granules and inhibition of the secretion of these organelles. This severely affected the motility of the parasites resulting in their inability to invade mammalian cells to cause the infection. These defects were restored by complementation of the TgREMIND mutants. We thus conclude that TgREMIND protein is probably involved in the formation of membrane vesicles that are required for the biogenesis of the specific secretory organelles of *T. gondii*. The second part of my thesis focused on the TgSTART protein, lipid partner of TgREMIND. We have characterized TgSTART from transgenic parasites and the knockdown mutant of the TgSTART gene tagged with the HA epitope.



REMERCIEMENTS

- ✚ Je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes, qui de près ou de loin ont contribué de n'importe quelle façon que ce soit, pour que je puisse réaliser ma thèse de doctorat dans de bonnes conditions, en cotutelle entre l'Université Paris-Saclay (UPS), France et l'Université d'Abomey-Calavi (UAC), Bénin.
- ✚ Je remercie le Ministère des affaires étrangères de la France et l'Union Economique et Monétaire Ouest Africaine (UEMOA) pour leur financement qui a permis l'aboutissement de ce travail.
- ✚ Je remercie l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC) de l'UPS pour l'accueil et le soutien surtout pour toutes les démarches administratives qui ont facilité mes séjours et le déroulement de cette thèse, sans oublier le financement de deux mois de ma thèse
- ✚ Je tiens à remercier mon co-directeur de thèse, Dr Stanislas TOMAVO, chef de l'équipe de Trafic Intracellulaire et Biogenèse des Organites chez *Toxoplasma gondii* (TIBOT) à I2BC, de m'avoir accepté dans son laboratoire, d'avoir encadré ce travail et aussi pour son investigation scientifique et financière pour la finalisation de ce travail.
- ✚ Je remercie très sincèrement ma co-directrice de thèse Prof Lucie AYI-FANOU, pour sa contribution scientifique et aussi pour son soutien moral lors de ma thèse.
- ✚ Je tiens à dire un profond merci aux différents membres du comité de suivi individuel de thèse de la France et du Bénin, qui de par leurs disponibilités et suivis permanents, leurs encouragements et conseils ont permis l'aboutissement de ce travail.
- ✚ Je remercie le prof Akadiri YESSOUFOU d'avoir accepté de président le jury de cette thèse. Je dis aussi un grand merci au Dr Sylviane PIED, au Dr Catherine Laure TOMASETTO et au Prof Lamine BABA MOUSSA d'avoir accepté évaluer cette thèse en tant que rapporteurs, également je remercie Dr Guy TRAN VAN NHIEU et Dr SENOU Maximin pour avoir accepté examiner mon mémoire de thèse.
- ✚ Je remercie également tout le personnel de la plateforme de la microscopie photonique et de la microscopie électronique de l'I2BC pour m'avoir montré l'usage des microscopes lors de ma thèse.

- ✚ Je dis également merci aux différents membres de l'équipe TIBOT que j'ai eu l'occasion de rencontrer lors du déroulement de ma thèse, en particulier Mahendra JAMDHADE, Omar NDAO, Ariane H. HONFOZO et Scott THOMAS pour nos échanges scientifiques et pour les moments passés ensemble.
- ✚ Je tiens à dire un grand merci au Dr Sophie ZINN-JUSTIN et au Dr José Luis VAZQUEZ-IBAR pour leur collaboration lors du déroulement de cette thèse.
- ✚ Je remercie aussi Dr Mènonvè ATINDEHOU et prof Ambaliou SANNI pour n'avoir ménagé aucun effort en vue de favoriser le bon déroulement de ma thèse.
- ✚ Je dis un grand merci à toute la famille HOUNGUE et SINOUVO, en particulier à mon frère Frédy HOUNGBO, à mes sœurs Mireille HOUNGUE et Emérite H. HOUNGUE, à mon amie Dr Mariette TAMEGNON, sans oublier mon oncle José HOUNGUE pour vos divers soutiens et prières en ma faveur. Je ne remercierai jamais assez mes très chers parents, mon papa Hounbo Avocès HOUNGUE et ma maman Hounsiabè SAGBO, qui de par leur qualité humaine et aussi à travers leur prière et bénédiction sont toujours pour moi un grand secours et le seront pour toute ma vie.

Que Dieu vous préserve et vous accorde santé, longue vie et bonheur.

Communication orale

Présentation orale à la 8^{ème} journée du Département de Biologie Cellulaire de l'I2BC à l'université Paris-Saclay (France), le 02 Décembre 2021

<< **TgREMIND is an essential *Toxoplasma* regulator of membrane biogenesis and parasite survival** >>

Articles

An Image-based high-content screening for compounds targeting *Toxoplasma gondii* repurposes inhibitors against the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.

Ariane Honfozo¹, Rodrigue Hougue¹, Alexandre Vandeputte², Sébastien Dechavanne³, Odilon Nouatin⁴, Ménonvè Cynthia Atindehou⁵, Lucie Ayi Fanou⁵, Achille Massougbojji⁴, Célia Dechavanne³, Priscille Brodin^{2,#} and Stanislas Tomavo^{1,#,*}. (2023) *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.

***Toxoplasma* Membrane Inositol Phospholipid Binding Protein TgREMIND Is Essential for Secretory Organelle Function and Host Infection.**

Rodrigue Hougue¹, Lamba Omar Sangare^{2,#}, Tchilabalo Dilezitoko Alayi³, Aissatou Dieng¹, Tristan Bitard-Feildel⁴, Claire Boulogne^{1,5}, Christian Slomianny⁶, Cynthia Menonve Atindehou⁷, Lucie Ayi Fanou⁷, Yetrib Hathout³, Jeroen PJ Saeij², Isabelle Callebaut⁴ and Stanislas Tomavo¹. * DOI: 10.1101/2023.03.19.533351 (bioRxiv), (soumis à Cell Repport).

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	iii
COMMUNICATION ORALE.....	v
Liste des Figures.....	ix
Liste des Tableaux.....	x
Listes des abréviations	xi
Introduction	2
Partie 1 : Généralités sur <i>T. gondii</i> , un parasite <i>Apicomplexa</i>	4
I Présentation des parasites <i>Apicomplexa</i>	4
I-1 <i>Cryptosporidium</i> spp	5
I-2 <i>Eimeria</i> spp	5
I-3 <i>Plasmodium</i> spp	5
I-4 <i>Toxoplasma gondii</i>	6
II Biologie de <i>T. gondii</i> , agent causal de la toxoplasmose	6
II-1 Cycle biologique de <i>T. gondii</i> et les différents stades parasitaires	6
II-2 La toxoplasmose	9
II-3 Les organites caractéristiques de <i>T. gondii</i> : un modèle d'étude des <i>Apicomplexa</i> ...	16
III-Biogénèse des trois organites sécrétoires spécifiques chez <i>T. gondii</i>	21
III-1 Biogénèse des Micronèmes	21
III-2 Biogénèse des rhoptries	22
III-3 Biogénèse des granules denses	23
IV-Composition et fonctionnement du glideosome lors de l'invasion de la cellule hôte.....	23
V-Phénomène d'invasion de la cellule hôte par <i>T. gondii</i> et les différentes protéines impliquées.....	25
V-1 Liaison de <i>T. gondii</i> à la membrane plasmique de l'hôte	25
V-2 Orientation du pôle apical de <i>T. gondii</i>	25
V-3 Mise en place de la jonction mobile	25
V-4 Mise en place de la vacuole parasitophore et sa membrane	26

VI-Acquisition des nutriments et division de <i>T. gondii</i> au sein de la cellule hôte par endodyogénie.....	28
VI-1 Acquisition des nutriments par <i>T. gondii</i>	28
VI-2 Division de <i>T. gondii</i> au sein de la cellule hôte par endodyogénie	30
VII- Trafic intracellulaire chez les <i>Apicomplexa</i> et les facteurs impliqués : cas de <i>T. gondii</i>	31
VII-1 Transport antérograde des protéines	31
VII-2 Transport rétrograde et recyclage du récepteur cargo.....	37
VII-3 Mécanisme de sécrétion des protéines de micronèmes, rhoptries et granules denses et leurs rôles chez <i>T. gondii</i>	40
VII-4 Transport des lipides chez <i>T. gondii</i>	47
VIII Rôles des domaines Bin-Amphiphysin-RVS (BAR), Set Binding Factor (SBF2) et myotubularin-related (MTMR) lipid phosphatases des protéines chez les eucaryotes.....	50
Problématique.....	51
Partie 2 : Matériels et méthodes	54
I-Culture cellulaire.....	54
I-1 Culture des fibroblastes humains et entretien de <i>T. gondii</i>	54
I-2 Purification parasitaire	54
II-Biologie moléculaire.....	54
II-1 Extraction de l'ADN génomique des tachyzoïtes de <i>T. gondii</i>	54
II-2 Extraction de l'ARNm des tachyzoïtes de <i>T. gondii</i>	55
II-3 Obtention de l'ADNc par rétrotranscription	55
II-3 Construction du mutant iKO- <i>Tg</i> REMIND par clonage dans le plasmide pG13-D-T7S4.....	56
II-4 Complémentation du mutant iKO-HA- <i>Tg</i> REMIND par clonage dans le vecteur pUPRT	56
II-5 Obtention des parasites transgéniques par la technique de Knock-In.....	57
II-6 Obtention du mutant de Knockdown de <i>Tg</i> START par la technique d'Auxine dégron inductible.....	57

II-7 Transfection des parasites	58
III-Biologie cellulaire	61
III-1 Test d'invasion	61
III-2 Mesure de la motilité parasitaire.....	62
III-3 Test de plage de lyse.....	62
III-4 Immunofluorescence indirecte.....	62
III-5 Microscopie électronique.....	63
IV-Biochimie	64
IV-1 Production et purification des protéines recombinantes.....	64
IV-2 Electrophorèse en gel d'acrylamide	64
IV-3 Western Blots	65
IV-4 GST-pull down	66
IV-5 Fractionnement cellulaire	66
V-Analyses statistiques.....	66
Partie 3 : Résultats, Discussion, Conclusion et Perspectives	72
RESULTATS	72
I- <i>TgREMIND</i> , fixateur des phosphoinositides est essentielle pour la sécrétion des organites chez <i>Toxoplasma</i> et à l'infection de la cellule hôte	72
II Caractéristiques de <i>START domain containing protein (TgSTART)</i> un des transporteurs de lipide chez <i>T. gondii</i>	74
II-1 Analyse de la séquence de <i>TgSTART</i>	121
II-2 Expression de <i>TgSTART</i> chez les parasites transgéniques de <i>T. gondii</i>	122
II-3 Distribution de <i>TgSTART-HA3x</i> par rapport aux organites et compartiments connus chez <i>T. gondii</i>	123
II-4 Expression de <i>TgSTART</i> chez les parasites mutants Knockdown inductibles.....	125
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	127
PERSPECTIVES.....	132
Références Bibliographiques	133

Liste des Figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique du phylum des <i>Apicomplexa</i>	4
Figure 2 : Morphologie des différents stades parasitaires de <i>Toxoplasma gondii</i>	7
Figure 3 : Cycle de vie de <i>T. gondii</i> chez le chat.	8
Figure 4 : Voie de contamination de <i>T. gondii</i>	11
Figure 5 : Réponse innée de l'hôte lors de l'infection toxoplasmique et sa modulation par <i>T. gondii</i>	15
Figure 6 : Structure longitudinale de tachyzoïte de <i>T. gondii</i> avec ses principaux organites	16
Figure 7 : Schéma représentatif de l'organisation de la pellicule de <i>T. gondii</i>	19
Figure 8 : Complexe apical du cytosquelette cortical de tachyzoïte de <i>T. gondii</i>	20
Figure 9 : Schéma de la machinerie moléculaire (glideosome) impliquée dans la motilité de <i>T. gondii</i> lors de l'invasion de la cellule hôte.....	25
Figure 10 : Modèle du processus d'invasion de la cellule hôte par <i>T. gondii</i>	27
Figure 11 : Dépendance nutritionnelle connue ou prévue de <i>T. gondii</i> vis-à-vis de la cellule de mammifère infectée.	30
Figure 12 : Composition protéique des vésicules COPI et COPII.	33
Figure 13 : Schéma représentant le transport intracellulaire des protéines MICs et ROPs associées à <i>TgSORT</i> et le recyclage de <i>TgSORT</i> chez <i>T. gondii</i>	37
Figure 14 : Voies rétrograde et de recyclage endosomales des récepteurs chez les eucaryotes.	40
Figure 15 : Système de sécrétion des protéines des rhoptries et des micronèmes chez <i>T. gondii</i>	44
Figure 16 : Stratégie d'obtention des parasites transgéniques de <i>TgSTART</i>	60
Figure 17 : Génération du mutant knockdown <i>TgSTART</i> -AID-3HA	61
Figure 18 : Différents domaines et structures prédictives de <i>TgSTART</i>	122
Figure 19 : Localisation subcellulaire de <i>TgSTART</i> tagguée HA3x chez les parasites transgéniques	123
Figure 20 : Western Blots du lysat des parasites transgéniques de <i>TgSTART</i> -HA3x avec l'anticorps anti HA	123
Figure 21 : Distribution de <i>TgSTART</i> -HA3x chez <i>Toxoplasma gondii</i>	125
Figure 22 : Obtention du mutant knockdown <i>TgSTART</i> -3HA-AID	126

Liste des Tableaux

Tableau I : Différents complexes formés entre les protéines de micronèmes et de rhoptries ainsi que leurs rôles.....	42
Tableau II : Localisation subcellulaire et ligands des différentes protéines STARD humaines	48
Tableau III : Oligonucléotides et enzymes de restrictions utilisées pour les clonages	67
Tableau IV : Liste des plasmides et enzymes restrictions utilisées	68
Tableau V : Liste des anticorps utilisés.....	69

Listes des abréviations

AMA1	:	Apical Membrane Antigen 1
ApiAT	:	Apicomplexa Amino Acids Transportors
ARO	:	Armadillo Repeats Only Protein
ATc	:	Anhydrotétracycline
BAR	:	Bin-Amphiphysin-RVS
CDP-DAGs	:	Cytidine Diphosphate-diacylglycerol
COP	:	Coatomer protein
CPY	:	Carboxypeptidase Y
DAG	:	Diacylglycérol
DG	:	Dense granule
DHFR-TS	:	Dihydrofolate Réductase
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DrPB	:	Dynamamin-related Protein B
DTT	:	DiThioThréitol
ELC	:	Endosomal-Like Compartment
GAP	:	Glideosome Associated Proteins
GPI	:	Glycosyl-phosphatidylinositol
GRA	:	Dense granule proteins
HFF	:	Human Foreskine Fibroblast
HOPS	:	Homotypic Vacuole Fusion and Protein Sorting
HP	:	Hypothetical protein
ICAM-1	:	Intracellular Adhesion Molecule 1
IF	:	Immunofluorescence
IFN-γ	:	Interféron- γ
IgG	:	Immunoglobulines G
IL-12	:	Interleukine 12
IMC	:	Complexe membranaire interne
JM	:	Jonction mobile
M2AP	:	Micronems Associated Proteins 2
MAPK	:	Mitogen-Activated Protein Kinase
MICs	:	Microneme Proteins

MP	:	Membrane Plasmique
MVP	:	Membrane de la Vacuole Parasitophore
MyoH	:	Myosine H
NK	:	Natural Killer
NLR	:	Nod-Like Receptor
NP	:	Neutrophiles
PAF	:	Paraformaldéhyde
PBS	:	Phosphate Buffer Saline
PCR	:	Polymérisation de la Réaction en Chaîne
PH	:	Pleckstrin Homology
PI	:	Phosphatidylinositol
PI3P	:	Phosphatidylinositol 3-Phosphate
PIPs	:	Phosphoinositides
PMSF	:	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PS	:	Phosphatidylsérine
PT	:	Phosphatidylthréonine
PTS	:	Phosphatidylthréonine Synthase
RE	:	Réticulum Endoplasmique
RON	:	Rhoptries Neck Proteins
ROP	:	Rhoptries Bulb Proteins
SBF2	:	Set Binding Factor 2
SNARE	:	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptors
SNX	:	Sorting Nexin Proteins
SRP	:	Signal Recognition Particle
STARD	:	Start Domaine
START	:	StAR-related lipid transfer
STX	:	Syntaxines
TFPs	:	Transporter Facilitator Proteins
TgACβ	:	<i>Toxoplasma gondii</i> adenylate cyclase β
TgAIP	:	<i>Toxoplasma gondii</i> ARO Interacting Protein
TgAP1	:	<i>Toxoplasma gondii</i> clathrin Adaptor Protein 1
TgATrx	:	<i>Toxoplasma gondii</i> Thioredoxines
TgATs	:	<i>Toxoplasma gondii</i> Adenosin Transpoter Protein

TgCA-RPs	:	Toxoplasma gondii carbonic anhydrase-related proteins
TgCEN	:	<i>Toxoplasma gondii</i> Centriol protein
TgIST	:	Inhibitor of STAT1-dependent Transcription in <i>Toxoplasma gondii</i>
TgMIC2	:	Protéine de micronème 2 de <i>Toxoplasma gondii</i>
TgMyoA	:	<i>Toxoplasma gondii</i> Myosine A
TgMyoF	:	<i>Toxoplasma gondii</i> Myosine F
TGN	:	Trans-Golgi Network
TgREMIND	:	<i>Toxoplasma gondii</i> Regulators of Membrane Interacting Domains
TgSORT	:	<i>Toxoplasma gondii</i> sortiline Receptor
TgTFP1	:	Transpoter family protein 1 in <i>Toxoplasma gondii</i>
TgVPS	:	Vacuolar protein sorting in <i>Toxoplasma gondii</i>
ToxoDB	:	Toxoplasma data base
VP	:	Vacuole parasitophore

**PARTIE 1 : GENERALITES SUR *T. GONDII*, UN
PARASITE *APICOMPLEXA***

Introduction

Le phylum des *Apicomplexa* regroupe les parasites intracellulaires obligatoires, responsables de graves pathologies aussi bien chez les humains que chez les animaux (Füssy et Oborník 2017) ; (Frénal et Soldati-Favre, 2013). En dehors des organites classiques communs aux cellules eucaryotes, les parasites *Apicomplexa* possèdent des organites sécrétoires spécifiques tels que les rhoptries, les micronèmes et les granules denses (Sheiner et al., 2008). Ces organites caractéristiques parasitaires renferment des facteurs de virulence indispensables à l’envahissement de la cellule hôte par les parasites, à leur survie et à leur pathogénicité (Gubbels et Duraisingh, 2012). Dans ce groupe de parasite, figurent *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum*. *P. falciparum* est responsable du paludisme en Afrique, en Europe, en Amérique avec des cas de décès variable d’une année à une autre (Lopez-Perez et al. 2016). Environ plus de 405.000 cas de décès palustre dû à *P. falciparum* ont été enregistrés dans le monde en 2018 et plus majoritairement en Afrique (Organization, 2018). S’agissant de *T. gondii*, il infecte de façon très fréquente un large spectre d’hôtes à sang chaud en causant la toxoplasmose, une maladie déjà développée par plus de deux milliards de personnes dans le monde (Tenter et al., 2000) ; (Hammoudi et al., 2018). L’infection due au toxoplasme est chronique et passe inaperçue dans la majorité des cas mais constitue néanmoins de véritable menace pour tous et surtout pour les sujets immunodéprimés et les nouveau-nés pour qui elle peut être mortelle (Montoya *et al.*, 2004) ; (Nissapatorn et al., 2009). Grâce aux facteurs de virulence MICs et ROPs, *T. gondii* pénètre activement au sein de la cellule hôte. Le parasite crée lors de son entrée une vacuole parasitophore (VP) au sein de laquelle il assure sa réplication ou division (Hakimi et al., 2017) à l’abri de la défense immunitaire de l’hôte grâce aux protéines ROPs et GRAs libérées dans le cytoplasme de l’hôte (Bougdour et al., 2014); (Boothroyd et Hakimi, 2020) ; (Mayoral et al., 2022) ; (Yifan et al., 2020). *T. gondii* prend le contrôle des fonctions biologiques (le métabolisme, la transcription et la respiration mitochondriale) de la cellule hôte pour assurer sa propre dépendance nutritionnelle grâce aux ROPs et GRAs (Buzoni-Gatel et al., 2008) ; (Blume et Seeber, 2018). Malgré sa virulence *T. gondii* présente certains avantages pour la recherche scientifique tel que la culture facile *in vitro* et la rapidité multiplicative faisant ainsi du parasite un modèle d’étude biologique des *Apicomplexa* (Kim et Weiss, 2004) ; (Sun et al., 2021).

Aujourd’hui, la lutte contre la toxoplasmose aussi bien en Europe qu’en Afrique et même en Amérique comme en Asie rencontre des difficultés à cause de la toxicité des potentiels médicaments actuellement utilisés comme pyriméthamine et sulfamides. De plus ces drogues anti toxoplasmiques n’éliminent pas les kystes toxoplasmiques et aucun vaccin n’a été conçu

contre le parasite chez l'homme, augmentant l'ampleur de la toxoplasmose (Fellows et al., 2017). Tout cela incite à la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques, pour identifier de nouvelles drogues ou nouveaux médicaments. C'est dans ce cadre que s'inscrit la présente thèse de doctorat qui porte sur la protéine *TgREMIND* (*Toxoplasma gondii* *Regulators of Membrane Interacting Domains*).

Lors de mes travaux de recherches, nous avons démontré la fonction biologique de la protéine *TgREMIND* dans la biogénèse des organites spécifiques de *Toxoplasma gondii*. La protéine *TgREMIND* a été identifiée au sein de notre équipe TIBOT, comme partenaire spécifique de la protéine *TgVPS35* par immunoprécipitation (Sangaré et al., 2016). Le nom *TgREMIND* est dû aux fonctions prédictives des différents domaines de la protéine. En effet, la protéine *TgREMIND* est connue sous le nom de protéine hypothétique (HP) (ToxoDB) lors de sa découverte et possède des homologues aussi bien chez *Toxoplasma gondii* que chez certains parasites *Apicomplexa*. Les protéines hypothétiques sont très peu connues et leurs fonctions biologiques puis précisément dans le trafic intracellulaire et la biogénèse des organites sécrétoires spécifiques chez les *Apicomplexa* restent à élucider. Mes travaux de recherche visent à démontrer l'importance de la protéine *TgREMIND* chez *T. gondii*. En effet, il s'agit d'une première étude de la protéine *TgREMIND* qui nous a permis de décrire les mécanismes dans lesquels la protéine *TgREMIND* intervient lors du trafic intracellulaire des protéines et lipides pour la biogénèse des organites sécrétoires spécifiques indispensables à la survie de *T. gondii*. C'est ainsi que notre question de recherche était de savoir si l'absence de la protéine *TgREMIND* perturbe-t-elle la formation de ces organites spécifiques cruciaux nécessaires à l'infection toxoplasmique ?

Partie 1 : Généralités sur *T. gondii*, un parasite *Apicomplexa*

I Présentation des parasites *Apicomplexa*

Le phylum des *Apicomplexa* représente une partie des *Aveolata*, un groupe de protistes qui comprend les ciliés et les dinoflagellés (Fast et al., 2002). Dans ce groupe, les *Apicomplexa* regroupent un nombre important de parasites strictement intracellulaires obligatoires, soit environ plus de 6000 espèces (Adl et al., 2007) ; (Blader et al., 2015) et qui causent diverses maladies aussi mortelles tant pour les animaux que pour les humains (Janouškovec et al., 2019). Parmi ces parasites figurent *T. gondii*, *P. falciparum*, *Cryptosporidium parvum* et *Isospora spp* qui infectent l’homme avec un niveau d’émergence croissant et constituent de véritable menace pour la santé mondiale (Beck et al., 2009) ; (Campo et al., 2019). *T. gondii* cohabite dans le groupe des *Sarcocystidae* avec *Neospora* et *Isospora*, deux parasites *Apicomplexa* qui sévissent actuellement comme *T. gondii* dans le monde (Figure 1) (Elsheikha et al., 2005) ; (Beck et al., 2009). *Eimeria spp*, *Neospora spp*, *Babesia spp* et de *Theileria spp* sont également des parasites émergents qui infectent strictement les animaux et constituent ainsi de véritables problèmes pour l’élevage mondial (Elsheikha et al., 2005) ; (Füssy et Oborník, 2017) ; (Janouškovec et al., 2019).

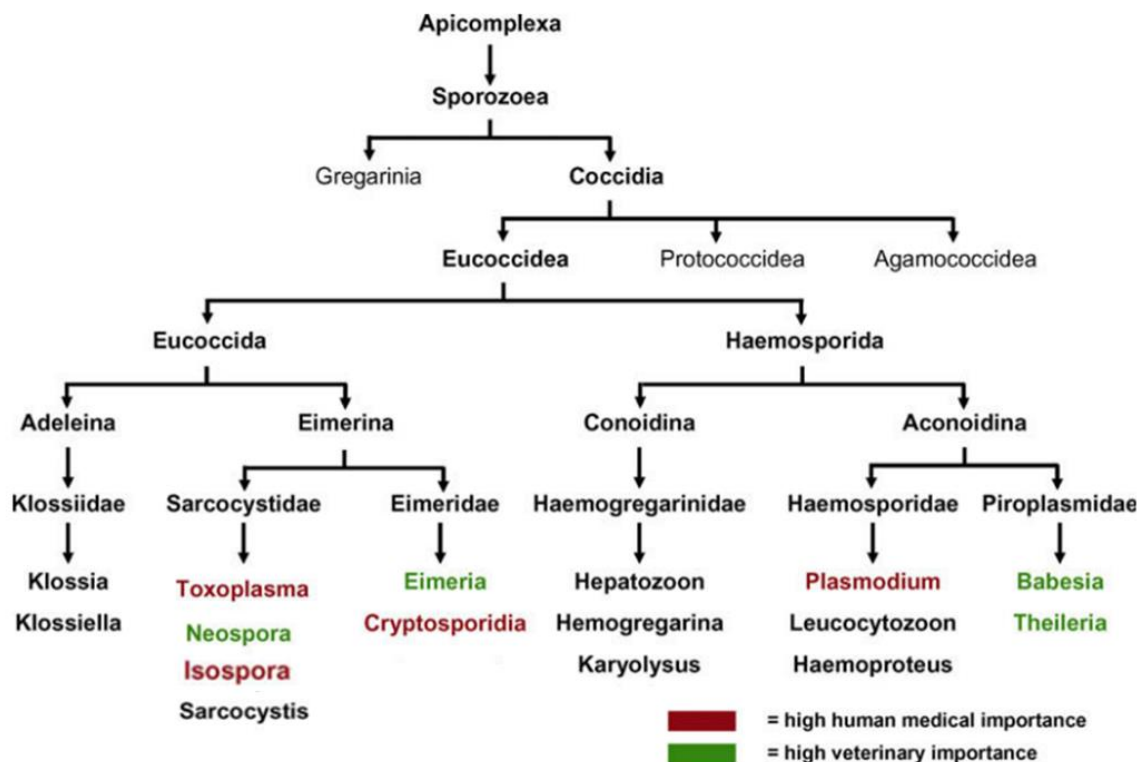


Figure 1 : Arbre phylogénétique du phylum des *Apicomplexa* (Elsheikha et al., 2005) ; (Beck et al. 2009).

I-1 *Cryptosporidium* spp

Le genre *Cryptosporidium* spp regroupe plusieurs espèces dont *C. ducismarci*, *C. testudinis*, *C. hominis*, *C. andersoni*, *C. muris*, *C. tyzzeri*, *C. erinacei* et *C. parvum* (Kostopoulou et al., 2015) ; (Qi et al. 2015) ; (Deng et al., 2017) ; (Inácio et al., 2017) identifiées le plus souvent dans les aliments y compris l'eau (Couso-Pérez et al., 2020). Ces parasites opportunistes causent la cryptosporidiose, une maladie diarrhéique mortelle chez les personnes immunodéprimées et les enfants de moins de 5 ans dans le monde (Troeger et al., 2018), (O'Connor et al., 2011) ; (Vinayak et al., 2015). D'après l'OMS en 2017, le taux de mortalité annuel de la diarrhée chez les enfants est estimé à près d'un tiers du taux de contamination annuel qui est plus de 1,7 millions (<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>); (Troeger et al., 2018). Les pays de l'Asie du sud et l'Afrique subsaharienne dont le Bénin enregistrent la majeure partie de ce taux de mortalité mondial (Kotloff et al., 2013). En France le taux de décès dû à la cryptosporidiose est plus enregistré chez les personnes immunodéprimées et est causé essentiellement par *Cryptosporidium parvum* (Costa et al., 2020).

I-2 *Eimeria* spp

Les parasites du genre *Eimeria* affectent exclusivement les animaux (domestique et sauvage) en causant la coccidiose, une maladie qui provoque de véritable perte économique sur le plan mondial (Beck et al., 2009) ; (Balta et al., 2021). Parmi ces parasites figurent plusieurs espèces dont : *Eimeria bovis*, *Eimeria zuernii*, *Eimeria alabamensis*, *Eimeria brasiliensis*, *Eimeria bukidnonensis*, *Eimeria canadensis*, *Eimeria cylindrica*, *Eimeria ellipsoidalis*, *Eimeria subspherica* et *Eimeria zuernii* (Velásquez et al., 2021) ; (Pyziel et al., 2014) ; (Cruvinel et al., 2018). Au Bénin, la prévalence de la coccidiose était estimée à 36,6% chez les troupeaux et oiseaux (Dakpogan et Salifou, 2013). Le taux de mortalité de la coccidiose chez les perdrix était compris entre 46,5%-52,1% en France (Naciri et al., 2011).

I-3 *Plasmodium* spp

Le genre *Plasmodium* spp regroupe les espèces comme *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale curtisi*, *P. malariae* et *P. knowlesi* responsables du paludisme dans le monde (Calderaro et al., 2013) ; (Beck et al., 2009). Le paludisme dû au *P. falciparum* est la forme la plus grave surtout chez les femmes enceintes et les enfants à travers le monde surtout en Afrique (Kalanon et McFadden, 2010).

I-4 *Toxoplasma gondii*

La toxoplasmose est une maladie cosmopolite aussi bien animale qu'humaine et qui est causée par *T. gondii*, l'unique espèce du genre *Toxoplasma*. La prévalence de la toxoplasmose humaine au Bénin est estimée à 48% chez les femmes (Ogouyèmi-Hounto et al., 2014). Au Bénin, *T. gondii* est à la base de près de 27% des cas de perte fœtale et d'environ 36% de mortalité néonatale chez les animaux (Tonouhewa et al., 2020). En Europe, la prévalence de la toxoplasmose était d'environ 67% chez les chats (Montazeri et al., 2020) alors que son estimation était de 27% chez les femmes (Nogareda et al., 2014). Faisant partie du phylum des *Apicomplexa*, la classification taxonomique de *T. gondii* se présente comme suit Règne : *Protista*, Phylum : *Apicomplexa*, Classe : *Coccidia*, Famille : *Sarcocystidae*, Sous-famille : *Toxoplasmatinae*, Genre : *Toxoplasma* et Espèce : *gondii* (Barta, 2001) ; (Levine, 1988).

II Biologie de *T. gondii*, agent causal de la toxoplasmose

II-1 Cycle biologique de *T. gondii* et les différents stades parasitaires

Le cycle de vie de *T. gondii* se déroule en deux grandes phases : la phase sexuée et la phase asexuée. En effet, lors de son évolution *Toxoplasma* effectue la phase sexuée de son cycle chez les félinés dont le chat qui est l'hôte définitif. Quant à la phase asexuée, elle se déroule chez les êtres vivants tels que : les mammifères, les oiseaux et les animaux aquatiques qui représentent l'hôte intermédiaire du parasite (Dubey *et al.*, 1998) ; (Dubey, 2009). Lors de ce cycle complexe, le parasite alterne ses différentes formes à savoir le tachyzoïte, le bradyzoïte et le sporozoïte (oocyste sporulé) au sein de ces différents hôtes (Figure 2). Le tachyzoïte (Figure 2A) est la forme virulente du parasite et est doté d'une multiplication plus rapide et est typiquement identifié dans les infections aiguës. S'agissant du bradyzoïte (origine des kystes tissulaires) (Figure 2B), c'est la forme de multiplication lente du parasite et caractéristique des infections chroniques chez l'hôte intermédiaire, contrairement au sporozoïte (Figure 2C) produit uniquement chez l'hôte définitif donc lors de la reproduction sexuée (Attias et al., 2020).

II-1-1 Phase sexuée

Chez *T. gondii*, la phase sexuée encore appelée la gamétogonie se déroule uniquement chez le chat son hôte définitif de référence (Kochanowsky et Koshy, 2018). Le chat s'infecte par les kystes toxoplasmiques qui se situent dans les petits oiseaux ou rongeurs. Dans l'estomac, en raison du probable niveau faible du pH, la paroi kystique est perturbée par l'action des enzymes protéolytiques libérant ainsi les bradyzoïtes (Figure 2D). Ces derniers vont envahir les cellules épithéliales et gagner ensuite les entérocytes au niveau desquelles il y a la schizogonie (une

série de division asexuée) générant des schizontes qui s'individualisent par fragmentation cytoplasmique en des mérozoïtes (Attias et al., 2020). Ces mérozoïtes se différencient par la suite en des microgamétocytes mâles et macrogamétocytes femelles dont les zygotes donnent des oocystes après fécondation. Possédant une taille de 10 à 12 µm de diamètre, ces oocystes sont entourés d'une double couche formant ainsi la paroi qui les protège. Dans l'environnement, le chat excrète ces oocystes qui sont sporulés dans un délai de 21 jours pour donner les oocystes sporulés (sporozoïtes haploïdes) très infectant pour les autres hôtes (Dubey et al., 1970) (Figure 3). Les oocystes sporulés peuvent survivre jusqu'à environ 15 mois à température ambiante, ou au moins 54 mois à 4°C ou encore à six mois dans l'eau de mer à température ambiante ou à 4°C (Dubey et al., 1998) ; (ANSES, 2011).

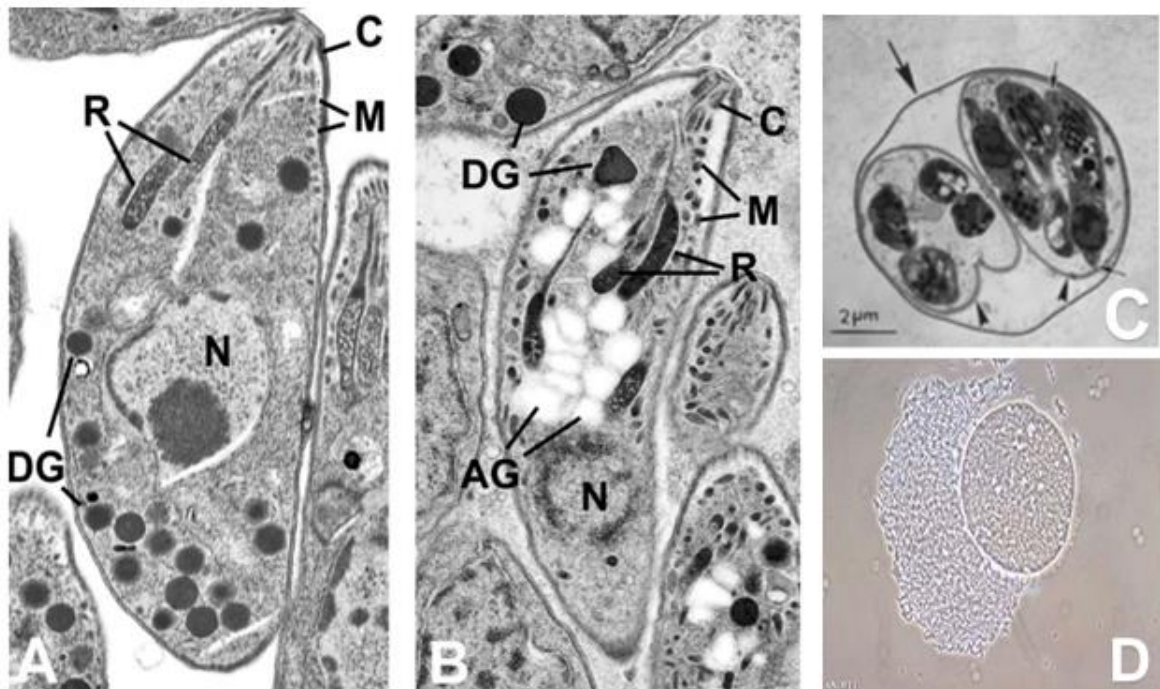


Figure 2 : Morphologie des différents stades parasitaires de *Toxoplasma gondii*
: **A)** Ultrastructure d'un tachyzoïte intracellulaire de *T. gondii* par microscopie électronique. **B)** Ultrastructure d'un bradyzoïte de *T. gondii* par microscopie électronique (Coppin et al., 2003) : DG : granule dense ; C : Conoïde ; M : Micronèmes ; N : Noyau ; R : Rhoptries, AG : Grains d'amylopectine (Coppin et al., 2003). **C)** Oocyste sporulé protégé par sa paroi (grande flèche) contenant deux sporocystes (têtes de flèches) renfermant chacun quatre sporozoïtes (petites flèches) (Dubey et al., 1998). **D)** Rupture de la paroi d'un kyste libérant plusieurs bradyzoïtes sous l'action des sucs digestifs (Anofel, 2014).

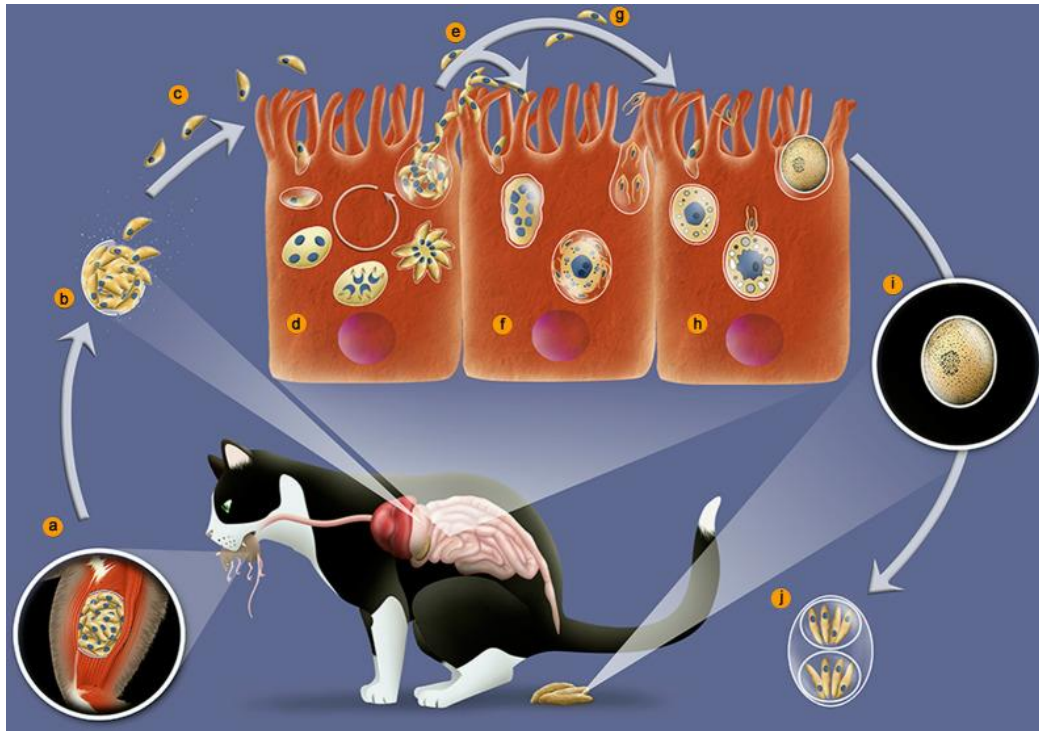


Figure 3 : Cycle de vie de *T. gondii* chez le chat (Attias et al., 2020) : **a**) ingestion de proie contient des kystes tissulaires. **b**) digestion de la paroi kystique dans l'estomac et dans l'intestin et libération des bradyzoïtes. **c**) envahissement des cellules épithéliales de l'intestin par les bradyzoïtes. **d**) division des bradyzoïtes par schizogonie dans les entérocytes en des schizontes qui se fragmentent en mérozoïtes. **e**) différenciation des mérozoïtes en des microgamétocytes mâles et macrogamétocytes femelles (**f**). **g**) fécondation des zygotes en oocystes non sporulés excrétés par le chat (**h**). **i**) sporulation avec genèse de deux sporocystes dont chacun contient quatre sporozoïtes (**j**).

II-1-2 Phase asexuée

Très souvent l'hôte intermédiaire est infecté par le parasite en ingérant les oocystes toxoplasmiques matures contenus dans les aliments souillés ou des kystes contenus dans les viandes contaminées (Figure 4). La paroi des oocystes (Figure 2C) et des kystes (Figure 2D) sont digérées par des enzymes digestives et les parasites libérés se différencient en tachyzoïtes (la plus virulente forme à division rapide). Ces tachyzoïtes sont entourés d'une vacuole parasitophore au sein de laquelle ils se divisent de façon binaire entre 6-8 h *in vitro* et se libèrent lorsque leur nombre atteint 64 à 128 par cellule à l'issue de 6 ou 7 cycles de division (Dubey et al., 1998) ; (Black et Boothroyd, 2000) ; (Gordon et al., 2008) ; (Nishi et al., 2008) (Figure 3). Les tachyzoïtes sont en mesure d'envahir toutes les cellules de l'hôte et d'induire la réponse immunitaire chez l'hôte (Black et Boothroyd, 2000) ; (Carruthers et Boothroyd, 2007). Parfois,

certaines tachyzoïtes non éliminés lors de la réponse immunitaire de l'hôte, se différencient en bradyzoïtes qui vont s'enkyster dans les tissus musculaires et nerveux : le système nerveux central, la rétine, ainsi que dans les muscles squelettiques ou cardiaques, conduisant ainsi à la forme chronique de la toxoplasmose (Gross et Pohl, 1996) ; (Tenter et al., 2000). La réactivation des kystes toxoplasmiques peuvent survenir en conduisant à de nouveaux tachyzoïtes, au moment où le système immunitaire de l'hôte est affaibli, ce qui peut provoquer une recrudescence massive et potentiellement mortelle (Black et Boothroyd, 2000).

II-2 La toxoplasmose

La toxoplasmose n'épargne aucun pays du monde et son estimation au niveau planétaire est de 30% avec la présence kystique dans la cerveau (Lyons, 2002). Cliniquement, quatre cas de figures de la toxoplasmose sont identifiés : la toxoplasmose acquise des sujets immunocompétents, la toxoplasmose de l'immunodéprimé, la toxoplasmose congénitale et la toxoplasmose oculaire. La toxoplasmose aigüe est presque asymptomatique jusqu'à 90% (Kravetz et Federman, 2005), les quelques rares signes cliniques tels que la fièvre, des malaises, les maux de gorges et des céphalées décrits par certains patients sont non spécifiques (Rorman et al., 2006). Chez les personnes immunodéprimées (personne souffrant du VIH-SIDA, du cancer, ou ayant reçu une greffe d'organe), l'encéphalite est confirmée comme signe clinique (Lyons et al, 2002). Le toxoplasme induit dans ce cas des lésions cérébrales ou encéphaliques diffuses, en perturbant le système nerveux central du malade lors d'une réactivation de la maladie puisque le système nerveux est défaillant (Montoya et Liesenfeld, 2004). Dans ce cas, certains organes tels que le cœur, le poumon, le foie sont parfois touchés, ce qui conduit à une perte de vie du patient.

II-2-1 Différentes voies d'infection

La transmission de la toxoplasmose se fait par plusieurs voies et implique obligatoirement les différentes formes du parasite y compris les kystes et les oocystes contenus dans les aliments et les tachyzoïtes situés à l'intérieur de la cellule hôte.

II-2-1-1 Infestation par ingestion des aliments

L'une des voies de la transmission de la toxoplasmose s'effectue par ingestion des aliments d'origine minérale (eau) et végétale souillés par les oocystes sporulés de l'hôte définitif (chat), par l'homme et les autres animaux (domestiques comme sauvages). L'homme est également contaminé lorsqu'il consomme les viandes généralement non cuites et qui contiennent déjà des kystes toxoplasmiques (renfermant de bradyzoïtes) (Figure 4) (Carruthers et Suzuki, 2007) ; (Attias et al., 2020).

II-2-1-2 Infestation par voie congénitale

La transmission congénitale est encore appelée transmission transplacentaire et se traduit par le passage des tachyzoïtes par voie placentaire de la mère au fœtus lorsque cette dernière est séropositive au toxoplasme (Jones et al., 2007) (Figure 4). La toxoplasmose congénitale est la source de graves fœtopathies dont la lésion neuronale et ophtalmologique, des convulsions, des malformations ou la perte fœtale et un retard mental chez le nouveau-né et parfois son décès (Ajzenberg et al., 2002 ; (Goldstein et al., 2008) ; (Lopes et al., 2007). Ces graves conséquences dépendent surtout de l'âge de la grossesse avant la primo-infection maternelle. Lors des trois premiers mois de la grossesse, le taux de la transmission fœtale est d'environ 25% et les conséquences sont telles que : la mort *in utero* du fœtus, des lésions cérébrales graves ou encore décès à la naissance. Au cours du deuxième trimestre de la grossesse prédomine la toxoplasmose sévère pouvant conduire à l'atteinte viscérale comme à la mort du nouveau-né. Mais au fur à mesure que la grossesse évolue le taux de transmission fœtale augmente et est d'environ 75% voire 95% respectivement au-delà du septième mois de la grossesse et les dernières semaines. A ce stade les conséquences sont moins graves mais non négligeables puisque l'immunité serait déjà mature par rapport au début de la grossesse (Mets et Chhabra, 2008).

II-2-1-3 Autres voies de contamination

Autre mode de transmission du toxoplasme est celle de la transfusion sanguine lors de laquelle les tachyzoïtes contenus dans le sang du donneur sont transmis dans l'organisme receveur. Il existe également le cas de contamination par une greffe d'organe ou de tissu renfermant déjà des kystes toxoplasmiques chez le donneur (Figure 4) (ANOFEL, 2014) ; (Attias et al., 2020).

En effet, quel que soit le mode de la transmission, la gravité de la toxoplasmose débouche sur diverses formes de la maladie telles que la forme multiviscérale, la forme ganglionnaire (caractérisée par l'adénopathie) et la forme oculaire. Cette dernière est marquée par la rétinite blanche et nécrosante ou parfois par une rétinite choroïdite pigmentée et elle varie d'un individu à un autre (Ozgonul et Besirli, 2017).

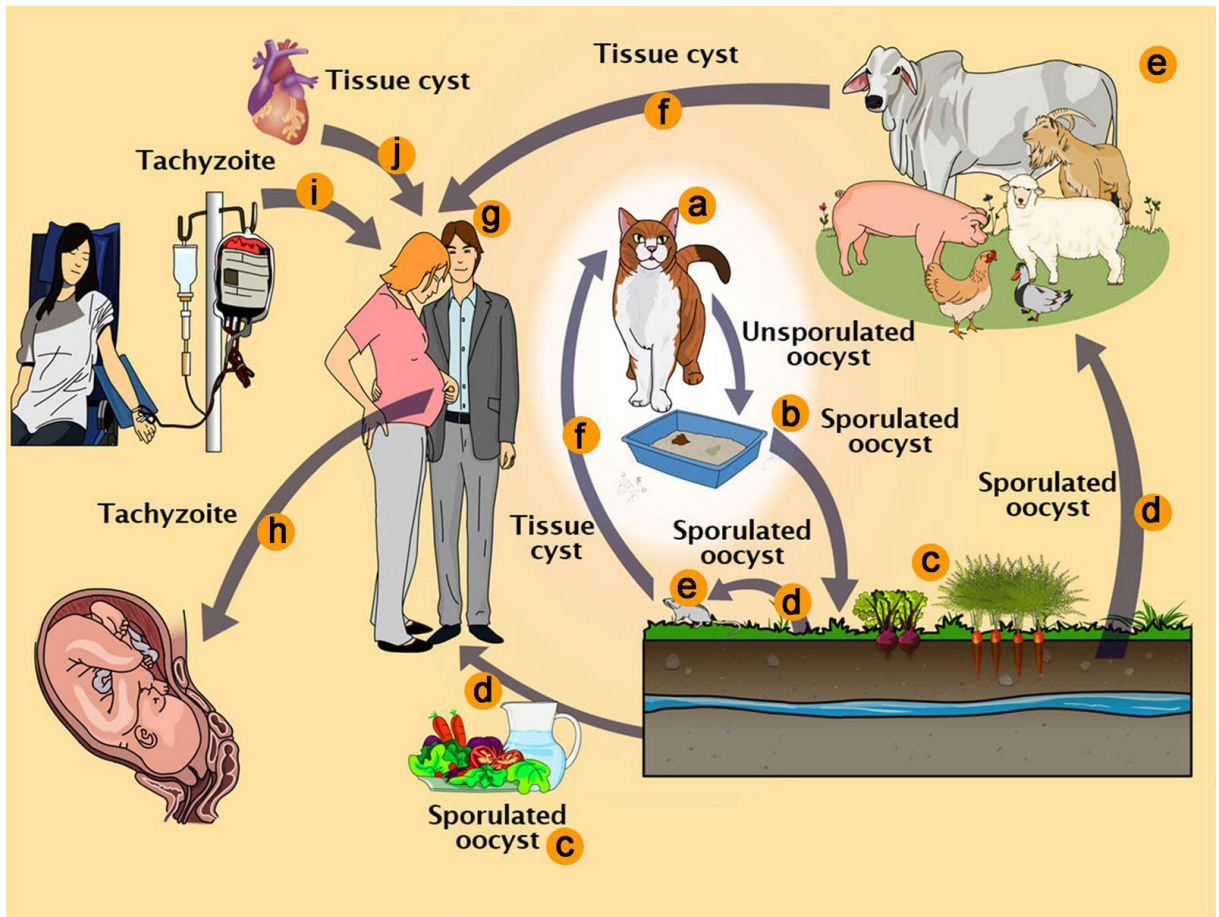


Figure 4 : Voie de contamination de *T. gondii* (Attias et al., 2020). **a)** Chat : hôte définitif. **b)** libération des oocystes par le chat. **c)** aliments contaminés par les oocystes sporulés. **d)** ingestion des oocystes sporulés par des hôtes intermédiaires via les aliments contaminés. **e)** hôte intermédiaire (exemple : bovins, volailles, rat). **f)** ingestion des kystes tissulaires contenus dans l'hôte intermédiaire. **g)** hôtes intermédiaires humains. **h)** infection du fœtus par les tachyzoïtes par voie placentaire. **i)** transmission des tachyzoïtes par transfusion sanguine et des kystes tissulaires par transplantation d'organe (**j**).

II-2-2 Diagnostic et traitement de la toxoplasmose

II-2-2-1 Diagnostic de la toxoplasmose

Le diagnostic de la toxoplasmose repose sur la détection de *T. gondii* avec une forte spécificité et sensibilité. Aujourd'hui plusieurs techniques de diagnostic sont utilisées dont la détection sérologique des immunoglobulines G (IgG) ainsi que leur avidité sérique. La connaissance de l'avidité nécessite aussi la recherche des anticorps IgA ou IgE comme IgM tous anti *Toxoplasma* qui renseignent non seulement sur la présence du parasite, mais donnent aussi plus de précision sur la période de l'infection (récente ou ancienne) (Remington et al., 2004). Ces détections se font par la technique d'enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ou par usage des kits commerciaux immunofluorescents aux anticorps anti *T. gondii* (également utilisée au Bénin). Dans d'autres cas, les techniques telles que la Polymérisation de Réaction en Chaîne (PCR) et le Western blot en ciblant certains antigènes de surface du parasite (P30, SAGs,...) sont aussi utilisées (Wang et Yin, 2014).

➤ **Diagnostic de l'infection acquise chez la femme enceinte**

Dans tous les cas de l'infection due au *T. gondii*, les premiers anticorps dirigés contre le parasite sont les IgM à un taux très élevé, dans un intervalle de 7 à 21 jours post infection et s'ensuit la production des IgG qui durent à vie. La seule présence des IgG en absence des IgM indique une infection ancienne, ce qui protège le fœtus mais il est nécessaire de reprendre une deuxième fois l'examen sérologique pour confirmer la stabilité des IgG (Suzuki et al., 2001) ; (Fricker-Hidalgo et al., 2013).

➤ **Diagnostic de l'infection congénitale chez le fœtus et chez le nouveau-né**

La toxoplasmose est identifiée chez le fœtus exclusivement par PCR qui est effectuée sur le liquide amniotique à 18 semaines ou plus de la grossesse pour amplifier l'ADN parasitaire si la mère est suspectée ou est testée positive, c'est la technique la plus utilisée en France (Romand et al., 2001). La toxoplasmose est aussi asymptomatique chez le nouveau-né, mais des altérations subtiles peuvent être observées et vont permettre ainsi de soupçonner la toxoplasmose (Moncada et Montoya, 2012). Cela est confirmé par la présence des IgA et IgM spécifiques ou des IgG de *T. gondii* (si l'enfant a déjà 1 an) et par la PCR (pour plus de précision) (Kotresha et Noordin, 2010) ; (Moncada et Montoya, 2012).

➤ **Diagnostic de l'infection chez les personnes immunodéprimées**

Le diagnostic de la toxoplasmose chez les immunodéprimés se fait exclusivement par la détection directe du parasite. Ce qui consiste soit un isolement de *T. gondii* dans les tissus du malade, soit par la PCR sinon par les deux techniques à la fois (Robert-Gangneux et al., 2015) ; (Montoya et Liesenfeld, 2004).

➤ **Diagnostic de la toxoplasmose oculaire**

La toxoplasmose oculaire est caractérisée par la présence du parasite dans la rétine entraînant ainsi une vision floue chez le patient (Delair et al., 2011) ; (Park et Nam, 2013). Son diagnostic est basé sur des examens ophtalmologiques des caractéristiques décrites ci-dessus avant d'être suivi par la détection des IgM et IgG, ce qui est parfois complété par la PCR qui porte sur les spécimens intraoculaires pour amplifier l'ADN de *T. gondii* (Harper et al., 2009) ; (Rothova et al., 2008).

II-2-2 Traitement de la toxoplasmose

La thérapie toxoplasmique est le plus souvent basée sur la combinaison des anti-parasitaires dont la plus fréquente est la combinaison de la pyriméthamine associée avec la sulfadiazine et l'acide folique (Montoya et Liesenfeld, 2004). Lorsque l'infection fœtale est confirmée, la femme enceinte est mise sous traitement précoce par combinaison de l'acide folique, de la pyriméthamine et de la sulfadiazine. Ce traitement est strictement spécifique aux femmes gestantes dont la grossesse date strictement de plus de 18 semaines afin d'éviter des malformations fœtales (effet tératogène) dues à la pyriméthamine (Remington, 2011). Le nouveau-né d'un an soupçonné ou déjà positif à l'infection est traité soit par de l'acide folique ou de la pyriméthamine soit par la clindamycine (Moncada et Montoya, 2012).

Pour la prévention de la toxoplasmose fœtale, lorsque la femme est à sa primo-infection dès la 18^{ème} semaine de sa grossesse, celle-ci est mise sous la spiramycine, c'est le cas en Europe et au Canada par exemple (Goldstein et al., 2008) ; (Avci et al., 2016). La spiramycine peut aussi être combinée avec la cotrimoxazole, pour réduire encore plus bas le taux de la transmission de l'infection au fœtus (Valentini et al., 2015).

La toxoplasmose est traitée chez les personnes immunodéprimées par l'atovaquone (Pearson et al., 1999) puisque la pyriméthamine impliquée dans la combinaison d'usage possède une activité antagoniste sur certains antiviraux dont la zidovudine (Gagliuso et al., 1990). Ainsi dans ce cas précis, l'usage de combinaison d'anti-parasitaire telle que la pyriméthamine et la sulfadiazine soit avec la clindamycine ou de triméthoprime ou encore avec de sulfaméthoxazole nécessitant une faible dose de la pyriméthamine (Gagliuso et al., 1990). S'agissant de la toxoplasmose oculaire, pour bloquer la prolifération du parasite et limiter la lésion de la rétine, le patient est souvent mis sous la combinaison d'antibiotique telle que la pyriméthamine avec de sulfonamide et de corticostéroïde (de-la-Torre et al., 2011).

II-2-3 Défense immunitaire de l'hôte contre la toxoplasmose

II-2-3-1 Réponse innée de l'hôte contre *T. gondii*

L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme dès l'introduction et la reconnaissance d'un corps étranger comme *T. gondii* par exemple. Cette dernière est caractérisée par l'action coordonnée des cellules dendritiques (DC), des macrophages, des lymphocytes NK et des neutrophiles (NP). Lors de la réponse innée, les différents motifs de récepteur cellulaire tels que les récepteurs Toll-like (TLR), récepteur Nod-like (NLR) et le récepteur de lectine de type C assurent la reconnaissance de l'agent pathogène (Beutler et al., 2006) ; (Sasai et Yamamoto, 2013). L'activation de la réponse innée de l'organisme face au *T.*

gondii (sous n'importe quelle forme) est l'œuvre d'une production immédiate des agents pro-inflammatoires (les cytokines) et les chimiokines indispensables à l'immunité innée. L'excrétion accrue de l'interleukine 12 (IL-12) est assurée par les cellules dendritiques, les macrophages et les neutrophiles puis l'interféron- γ (IFN- γ) est libérée par les lymphocytes NK (Denkers et al., 2004) ; (Scanga et al., 2002).

Chez la souris, l'expression d'IL-12 est stimulée suite à l'identification de la cyclophiline-18 de *T. gondii* (*TgCyp18*) par le récepteur de la chimiokine (CCR5) à la surface des DC (Sher et al., 2003) ; (Aliberti et al., 2000). Par contre chez l'humain, l'expression des cytokines IL-12, IL-18 et IL-1 β par les macrophages est stimulée par des protéines effectrices GRA15 et GRA24 de *T. gondii* (Mukhopadhyay et al., 2020). L'implication cruciale de CCR5 couplé à *TgCyp18* dans l'expression d'IL-12 reste inconnue pour le moment chez l'homme lors de l'infection due au parasite (Golding et al., 2003) ; (Andrade et al., 2013). L'IFN- γ produit en réponse à l'infection toxoplasmique active la transcription de plusieurs gènes aussi bien chez l'humain que chez la souris. Il stimule aussi la protéine p65 fixant le guanylate (GBPs) qui vise à éliminer le parasite (Suzuki et al., 1988) ; (MacMicking, 2012). L'IL-12 et l'IFN- γ entre autres sont deux médiateurs de l'immunité innée qui sont indispensables pour le contrôle de la toxoplasmose en réduisant la différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes au cours de la réponse innée de l'hôte (Sasai et al., 2018). A cela s'ajoute le monoxyde d'azote synthase et l'indoléamine-2,3 dioxygénase qui interviennent essentiellement dans la suppression de *T. gondii* (Sasai et al., 2018).

Il a été démontré que la dégradation du tryptophane dans les HFF a inhibé la réplication de *T. gondii*, mais ce dernier malheureusement arrive à bloquer la régulation positive de près de 127 gènes activés dans les HFF grâce aux protéines de rhoptries et celles de granules denses (Pfefferkorn 1984) ; (Kim et al., 2007). La β -caténine est un élément clé des composants du complexe de destruction chez les cellules eucaryotes et représente un activateur essentiel des lymphocytes T (Cadigan et Waterman, 2012). Il a été démontré que GRA18 se lie à la β -caténine pour contrôler le génome et reprogrammer l'inflammation aussi bien chez l'homme que chez la souris (He et al., 2018) ; (Cadigan et Waterman, 2012). De même, par le biais de sa protéine *TgIST* (*T. gondii* inhibitor of STAT1-dependent transcription) des granules denses, *T. gondii* interagit avec STAT1 pour stopper la production de l'IFN- γ inhibant ainsi la transcription dans les cellules humaines infectées (Rosowski et al., 2011) ; (Gay et al., 2016). De par son activité kinasique, la protéine ROP16 active les facteurs STAT3 et STAT6 par phosphorylation en diminuant le taux d'IL-12 (Saeij et al., 2007) ; (Ong et al., 2010). Cette baisse d'IL-12 ainsi que la non expression d'IL-1 β sont dues d'une part à l'inactivation des NP

et de NF- κ B liée à la non phosphorylation de p65/RelA et d'autre part au blocage du facteur caspase-1 et du facteur d'inflammasome NLRP3 par *T. gondii* (Lima et al., 2018) ; (Shapira et al., 2005), (Figure 5) (Lima et Lodoen, 2019).

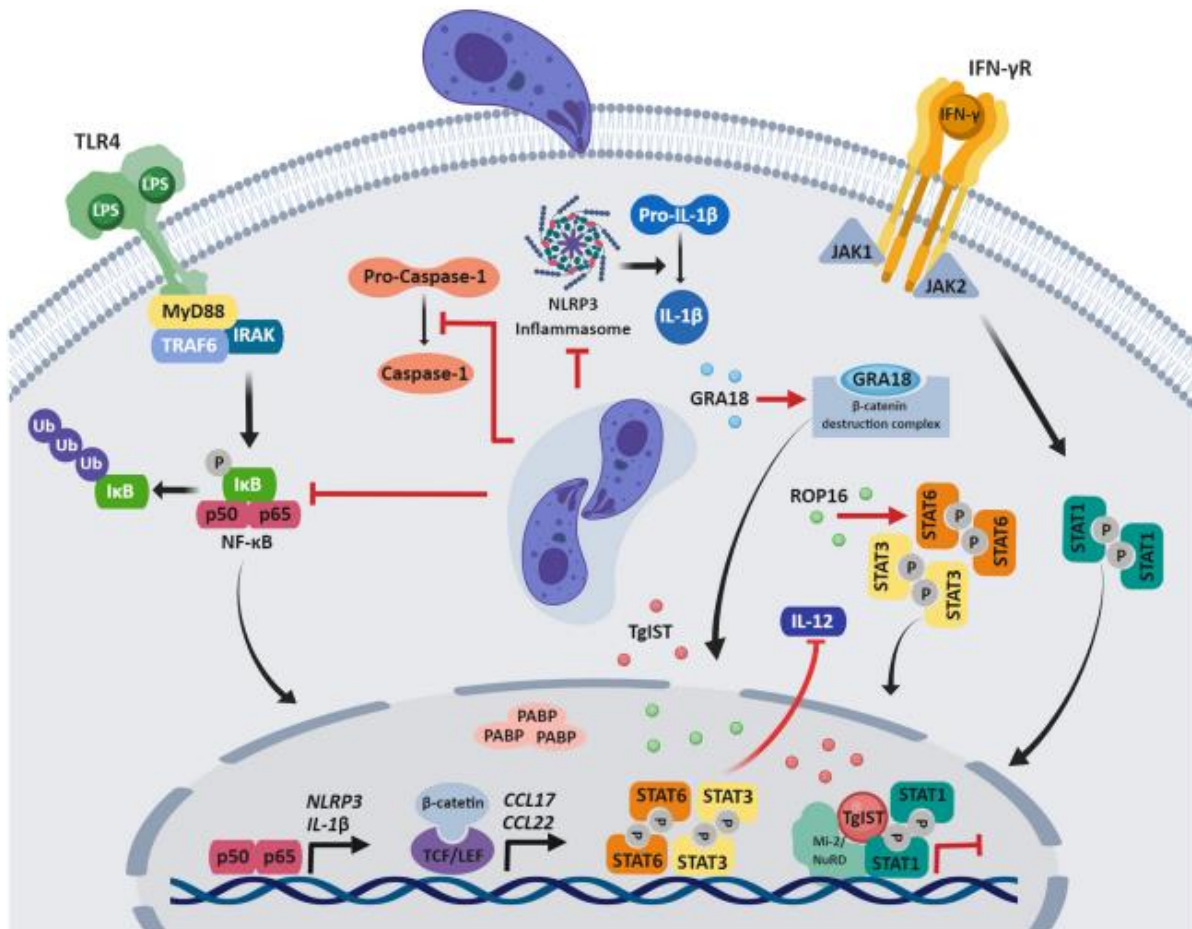


Figure 5 : Réponse innée de l'hôte lors de l'infection toxoplasmique et sa modulation par *T. gondii* (Lima et Lodoen, 2019).

II-2-3-2 Réponse adaptative de l'hôte contre *T. gondii*

La réponse adaptative anti *Toxoplasma gondii* de l'hôte est caractérisée d'une part par l'action des lymphocytes T ($CD4^+$ et $CD8^+$) et les cellules NK qui sécrètent l'IFN- γ de façon abondante et d'autre part par des IgA, IgM, IgE et IgG issues des lymphocytes B (Sana et al., 2022) ; (Roberts et McLeod, 1999). Ces anticorps produits par les lymphocytes B bloquent l'invasion de la cellule hôte par les tachyzoïtes extracellulaires uniquement (Jones et al., 2006). Ils optimisent la phagocytose puis activent instantanément la voie classique du complément, ce qui limite l'efficacité de cette phase pour la réponse contre *T. gondii* (Jones et al., 2006). Ainsi, seule l'action des $CD4^+$ et $CD8^+$ confèrent une bonne autonomie de résistance d'immunité à l'organisme face à *T. gondii* (Gaddi et Yap, 2007).

II-3 Les organites caractéristiques de *T. gondii* : un modèle d'étude des *Apicomplexa*

T. gondii est un organisme eucaryote comme tous les autres qui possèdent des organites communs comme : le noyau, le réticulum endoplasmique, la mitochondrie, le ribosome et l'appareil de Golgi. Cependant, ce parasite intracellulaire obligatoire possède en commun avec les autres parasites *Apicomplexa* des organites caractéristiques et propres à leur famille. Il s'agit entre autres des rhoptries, des micronèmes et des granules denses. Chez *T. gondii*, les tachyzoïtes ont une forme arquée et mesurent environ 10 µm de longueur sur 2 µm de largeur (Smith, 1995), avec différentes structures bien délimitées et qui forment son cytosquelette (Figure 6) (Attias et al., 2020).

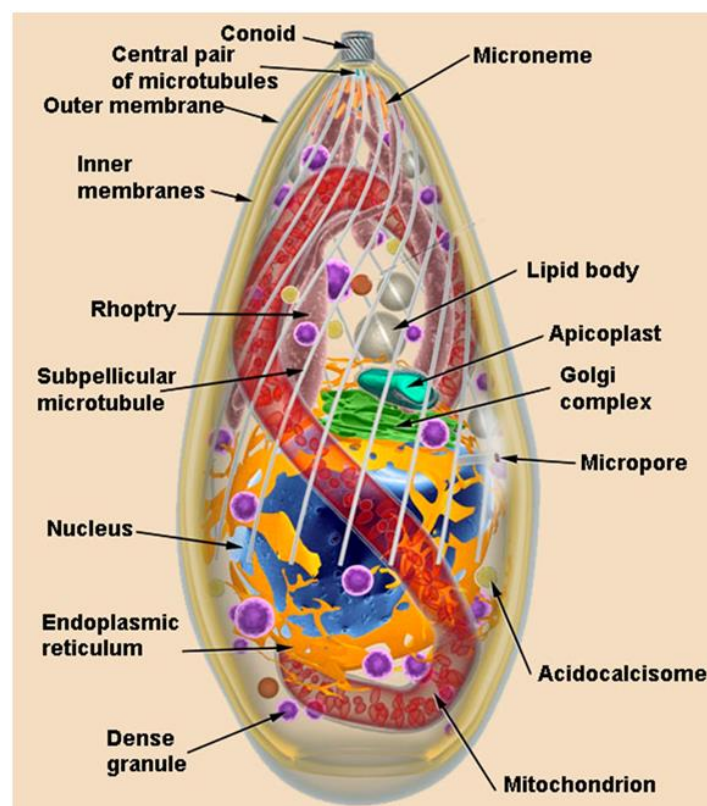


Figure 6 : Structure longitudinale de tachyzoïte de *T. gondii* avec ses principaux organites (Attias et al., 2020).

II-3-1 Les micronèmes

Les micronèmes sont les organites apicaux les plus petits du parasite et se présentent sous forme de petits bâtonnets dont la taille est d'environ 0,4 x 0,1 µm. Leur nombre varie en fonction de l'espèce et du stade de vie du parasite et leur sécrétion est régulée et survient rapidement tout juste à la suite du contact du parasite et la cellule hôte (Carruthers et Tomley, 2008). Les micronèmes se présentent sous deux différentes formes à savoir les micronèmes proximales logés au niveau du conoïde des parasites et les micronèmes distales situés le long de l'IMC. Il

a été montré que seuls les micronèmes distales disparaissent à la suite de la disruption des RAB5C et RAB5C par Cre-Lox (Kremer et al., 2013). Les micronèmes contiennent plusieurs protéines (MICs) indispensables pour la motilité des parasites et au processus d'invasion de la cellule hôte, mais aussi pour la sécrétion des rhoptries (Dubois et Soldati-Favre, 2019).

II-3-2 Les rhoptries

Les rhoptries sont aussi des organites apicaux comme les micronèmes et sont omniprésents chez les parasites *Apicomplexa*. Ce sont des organites membranaires situés du côté antérieur des parasites et possèdent une taille d'environ 1 à 4 µm de long. Leur nombre dépend non seulement de l'espèce mais aussi du stade parasitaire (Carruthers et Sibley, 1997) ; (Dubremetz 2007) ; (Suarez et al., 2019). Ainsi chez *T. gondii*, les tachyzoïtes possèdent environ 10 à 12 rhoptries (Boothroyd et Dubremetz, 2008). Les rhoptries contribuent activement à la mise en place de la jonction mobile (Alexander et al., 2005) ; (Sheiner et al., 2010), à la formation de la membrane de la vacuole parasitophore (MVP) en s'associant aux lipides et amènent la cellule hôte à répondre aux exigences du parasite (Dubremetz, 2007) ; (Bradley et Sibley, 2007). Le fractionnement subcellulaire des rhoptries a permis l'identification d'environ 38 protéines leur appartenant ainsi que la présence de grandes quantités de cholestérol et de phospholipides dont la phosphatidylcholine qui prédomine (Foussard et al., 1991) ; (Bradley et al., 2005). Les protéines de rhoptries sont présentes dans la jonction mobile, dans la vacuole, au niveau de la membrane de la vacuole parasitophore. Cela montre le rôle polyvalent des rhoptries dans la régulation des différents aspects de la survie intracellulaire du toxoplasme (Bradley et Sibley, 2007).

II-3-3 Les granules denses

Au sein de *T. gondii*, les granules denses (GD) constituent une population unique sous forme de microsphère sombre d'environ 200 nm de diamètre et sont omniprésents dans le cytosol du parasite (Mercier et al., 2007). Le nombre de granule dense dépend du parasite et varie aussi en fonction du stade parasitaire, ainsi les tachyzoïtes et sporozoïtes de *T. gondii* possèdent chacun environ 15 granules denses contre 8 à 10 granules denses chez les bradyzoïtes et enfin 3 à 6 granules denses dans les mérozoïtes (Lebrun et al., 2007). Le transport des granules denses dépend des filaments d'actine et de myosine de classe 27 (*TgMyoF*) (Heaslip et al., 2016) ; (Mercier et al., 2007). Ces organites sont caractérisés par un grand nombre de facteur de virulence appelé protéines de granule dense (GRAs).

II-3-4 La pellicule

La pellicule chez les *Apicomplexa* est un complexe tri-membranaire d'environ 60 nm d'épaisseur comprenant la membrane plasmique (MP) et deux autres membranes très rapprochées entre elles et appelées complexe membranaire interne (IMC) (Lentini et al., 2015) (Figure 7). Il existe un agencement régulier entre les trois membranes de la pellicule sous l'action coordonnée des différentes protéines pelliculaires. C'est ainsi que la déplétion de la protéine GAP45 « Glideosome Associated Proteins » de l'IMC avait créé une séparation de l'IMC de la MP (Jones et al., 2009). La pellicule grâce à ces trois membranes intervient au niveau structural des parasites et représente l'interface des échanges entre le couple hôte-parasite, elle est multifonctionnelle.

II-3-4-1 Membrane plasmique externe du parasite

La membrane plasmique (MP) est un assemblage de bicouche lipidique qui renferme des glycolipides et glycoprotéines. Chez *T. gondii*, les glycoprotéines de la MP sont caractérisées par l'ancrage des glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) qui sont des antigènes majeurs de surface du parasite, il s'agit des protéines : P22, P30, P35, P43 et appelés également SAGs (Surface Antigène) (Tomavo et al., 1989) ; (Boothroyd et al., 1998) ; (Rabjeau et al., 1997) ; (Lekutis et al., 2001). Grâce à cette composition de la MP plus ou moins complexe sur le plan lipidique que protéique, la MP joue plusieurs rôles chez *T. gondii* dont : le déplacement et l'attachement du parasite à la cellule hôte, le signalement de contact et l'invasion de la cellule hôte et interaction immunitaire avec l'hôte (Boothroyd et al., 1998).

II-3-4-2 Complexe membranaire interne (IMC)

Le complexe membranaire interne (IMC) est aussi l'un des organites caractéristiques des *Apicomplexa*. Il est composé de deux couches membranaires (interne et externe) toutes deux localisées sous la MP des parasites (Chen et al., 2017). L'IMC est un produit de la membrane du RE à partir de la fusion des vésicules aplaties (Vivier et Petitprez, 1969). La biogénèse de l'IMC chez les cellules filles lors de la réplication du parasite se fait au fur et à mesure que l'IMC maternel disparaît. Sa biogénèse est l'œuvre de plusieurs protéines dont *TgVp45* et *PfVp45* associée aux protéines syntaxines (Stx) 6 et 16 du complexe transmembranaire SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptors*) respectivement aussi bien chez *T. gondii* que chez *P. falciparum* (Koike et Jahn, 2019) ; (Bisio et al., 2020). Chez les tachyzoïtes et bradyzoïtes du *Toxoplasma gondii*, l'organite est constitué d'une seule plaque conique, localisée à environ 1 µm du pôle apical du parasite (Lentini et al., 2015). L'IMC encadre le parasite avec des ouvertures vers le pôle apical et l'extrémité basale

(Dziarszinski et al., 2004) ; (Del Carmen et al., 2009). L'IMC est caractérisé d'une stabilité structurelle spéciale et se situe au centre de la réplication et du développement des *Apicomplexa* (Hu et al., 2002) ; (Ouologuem et Roos, 2014). L'IMC est le siège du complexe moteur actine-myosine assurant la motilité parasitaire lors de invasion de la cellule hôte (Harding et Meissner, 2014). Chez *Toxoplasma*, 14 différents groupes de protéines de l'IMC (*TgIMCs*) contenant des domaines alvéolines sont identifiés et interviennent tous dans le cycle de vie du parasite (Harding et Meissner, 2014) ; (Dubey et al., 2017).

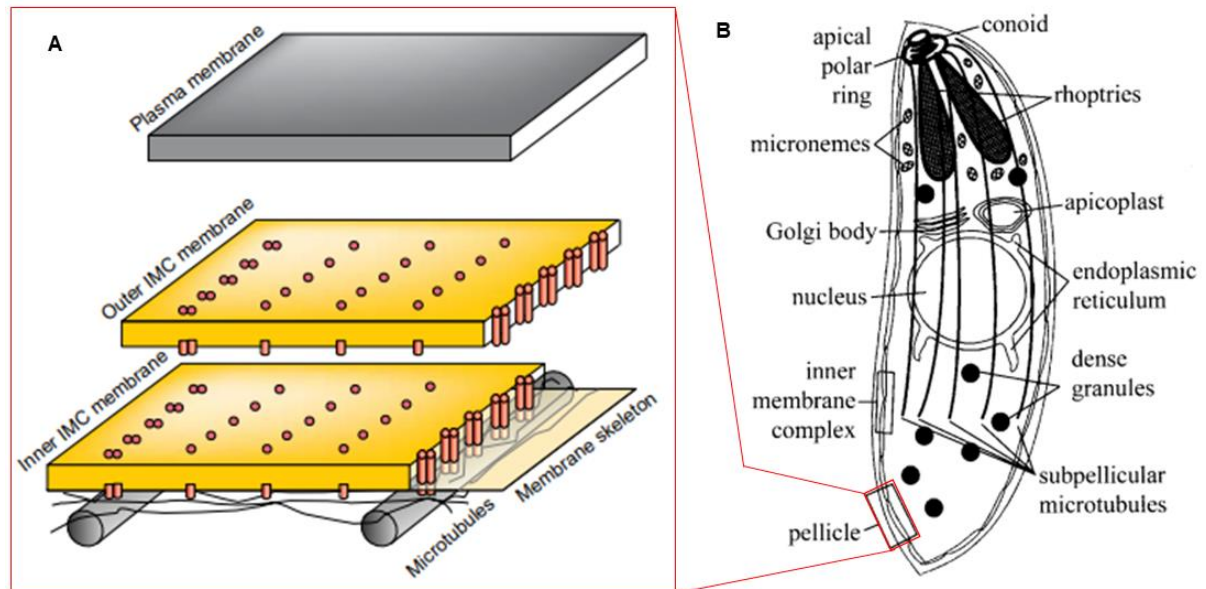


Figure 7 : Schéma représentatif de l'organisation de la pellicule de *T. gondii* **B**) Illustration des composants internes de tachyzoïte de *T. gondii* adopté de (Morrissette et Sibley, 2002). **A**) Agrandissement de la pellicule (encadrée en rectangle rouge en B). Elle regroupe la membrane plasmique et le complexe membranaire constitué de deux autres membranes une à l'intérieur et l'autre à l'extérieur (Keeley et Soldati, 2004).

II-3-5 Cytosquelette cortical

Le cytosquelette cortical est associé à la pellicule des parasites et regroupe un réseau de deux complexes à savoir un complexe basal logé au niveau postérieur des parasites et un complexe apical qui est constitué du conoïde, des microtubules intra conoïdaux et des anneaux pré et post conoïdaux (Figure 9) (Hu et al., 2002) ; (Nichols et Chiappino, 1987) ; (Morrissette et Sibley, 2002). Dans l'anneau post conoïdal se logent 22 microtubules sous-pelliculaires le long de l'IMC et s'étendent environ sur les deux tiers du long du parasite (Hu et al., 2002) ; (Hu et al., 2006). Grâce à ses constituants, le cytosquelette cortical intervient dans de nombreux processus vitaux chez le parasite et définit également la forme de ce dernier. Le conoïde est

caractérisé par une petite structure conique allant jusqu'à 250 nm de diamètre et est constitué de filaments spirales (Morrissette et Sibley, 2002) ; (Hu et al., 2002). Environ 200 protéines sont identifiées au niveau du complexe conoïdal apical de *T. gondii* dont l'actine, myosine et d'autres protéines qui interagissent avec l'actine (Hu et al., 2006). Trois calmodulines (CaM1, 2 et 3) logées dans les conoïdes contribuent aussi à la motilité, l'invasion de la cellule hôte et la sortie des parasites et interagissent avec la MyoH du conoïde (Long et al., 2017) ; (Graindorge et al., 2016). La formation du conoïde est provoquée par le niveau élevé du flux de Ca^{2+} intracellulaire (Del et al., 2009). Grâce aux protéines TgICMAP des microtubules intra conoïdaux, le cytosquelette cortical intervient également dans la division des tachyzoïtes de *T. gondii* (Heaslip et al., 2009).

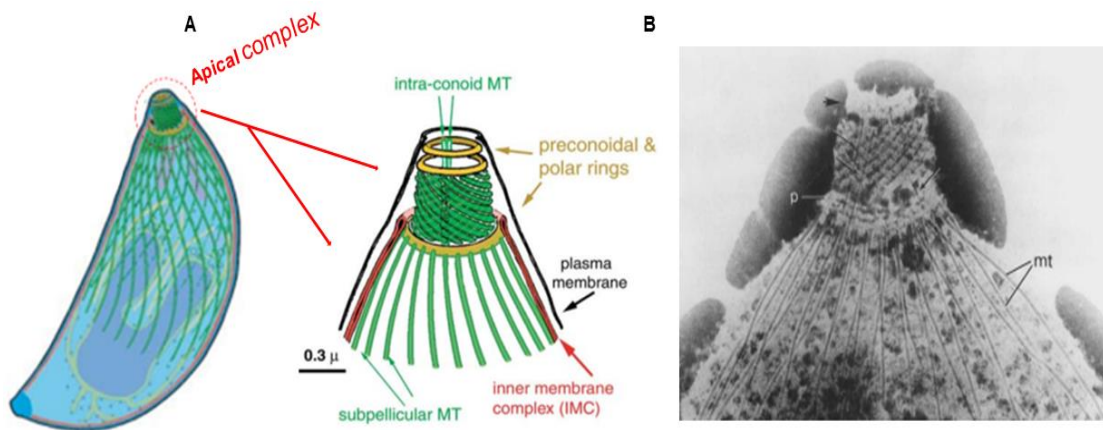


Figure 8 : Complexe apical du cytosquelette cortical de tachyzoïte de *T. gondii*. **A**) Schéma du complexe apical du cytosquelette cortical (Hu et al., 2002) encadré en pointillés rouge à gauche au niveau apical du tachyzoïte et agrandi à droite. **B**) complexe apical du cytosquelette cortical en microscopie électronique. mt : microtubules pelliculaires, p : anneau polaire, microtubules logés dans le conoïde (flèche noire) et les anneaux pré conoïdaux (pointe noire) (Nichols et Chiappino, 1987).

II-3-6 L'apicoplaste

L'apicoplaste ou plaste (non photosynthétique) est aussi un des organites communs des *Apicomplexa* et homologue du chloroplaste (responsable de la photosynthèse) chez les végétaux et caractérisé par quatre couches membranaires (McFadden, 2011) ; (Henkel et al., 2022). Chaque cellule de *T. gondii* contient un et un seul apicoplaste et qui pourrait contenir environ 5 à 10% des gènes exprimés chez le parasite (Henkel et al., 2022). Sa biogénèse est l'œuvre de plusieurs protéines exprimées au niveau du noyau et transférées vers le RE avant d'être transférées jusqu'à la membrane externe de l'apicoplaste où sont localisées les protéines

Thioredoxines (*TgATrx 1* et *2*) de l'apicoplaste puis incorporées dans l'organite par d'autres protéines dont la protéine *Tic20*, qui est une protéine de la membranaire interne de l'apicoplaste (DeRocher et al., 2008) ; (Biddau et al., 2018) ; (Henkel et al., 2022). Fortement impliqué dans le métabolisme lipidique, l'apicoplaste contient les voies de synthèse des acides gras de type II (FASII) (Waller et al., 1998) ; (Ralph et al., 2004) indispensable à la survie des parasites (Martins-Duarte et al., 2016). Ainsi grâce à la répartition équitable et efficace de ces lipides entre l'apicoplaste et les autres organites du parasite (Tomova et al., 2009), l'apicoplaste est impliqué dans la réussite de l'invasion de la cellule hôte, la formation ainsi que la maturation de la VP, donc dans la survie du parasite (Sheiner et Striepen, 2013).

III-Biogénèse des trois organites sécrétoires spécifiques chez *T. gondii*

Les organismes *Apicomplexa* doivent leur survie, leur multiplication et leur dissémination dans l'organisme hôte grâce aux organites sécrétoires spécifiques tels que les rhoptries, micronèmes et granules denses. La sécrétion des rhoptries et micronèmes se fait de façon régulée alors que les granules denses sont sécrétés de manière constitutive (Nishi et al. 2008) ; (Hallée et al. 2018). Chez les parasites, la biogénèse de ces organites implique le système endosomal et fait intervenir plusieurs protéines régulatrices dont le récepteur *TgSortiline*, *Dynamain related protein B* (*DrpB*), les protéines *Rab5A* et *Rab5C*, *Vacuolar protein sorting-associated proteins* (*TgVPS9* et *TgVPS35*) et *Adaptor protein 1* (*TgAP1*) (Ngô et al. 2003); (Sloves et al., 2012) ; (Breinich et al., 2009) ; (Sakura et al., 2016) ; (Sangaré et al., 2016) ; (Venugopal et al., 2017). Outre ces facteurs, les protéines des rhoptries, des micronèmes et des granules denses sont indispensables à la biogénèse des organites chez les parasites.

III-1 Biogénèse des Micronèmes

La motilité et l'envahissement de la cellule hôte par les *Apicomplexa* dépendent fortement de l'excrétion des micronèmes (Dubois et Soldati-Favre, 2019). Deux groupes de micronèmes sont identifiés au niveau du pôle apical de *T. gondii*, les micronèmes situés sous le conoïde et ceux situés latéralement le long du parasite (Kremer et al., 2013) ; (Matthiesen et al., 2001). La biosynthèse des micronèmes qui requiert une extrusion conoïdale a lieu sous l'anneau postérieur (Paredes-Santos et al., 2012). Chez les eucaryotes, la sortiline, une protéine transmembranaire de l'appareil de Golgi est un récepteur crucial dans le transport protéique entre le Golgi et les compartiments tels que les membranes, l'endosome et la lysosome (Hermeij, 2009). Chez les *Apicomplexa*, ce récepteur est indispensable à la biogénèse des organites sécrétoires spécifiques comme les micronèmes et les rhoptries en assurant le trafic

des protéines des micronèmes et des rhoptries de Golgi vers le compartiment de type endosomal (ECL) pour la biogénèse de ces organites sécrétoires (Sloves et al., 2012). Ainsi l'interruption de *TgSORT* a bloqué la biogénèse des rhoptries et micronèmes chez *T. gondii* (Sloves et al., 2012) contrairement à l'interruption de *PfSORT* qui a non seulement induit le blocage la biogénèse des rhoptries, mais également l'inhibition de la formation des granules denses et même de l'IMC chez *Plasmodium falciparum*, un autre parasite *Apicomplexa* (Hallée et al., 2018). En revanche, les auteurs n'ont pas décrit que la disruption du *PfSORT* chez *P. falciparum* entraînerait de modifications fonctionnelles des micronèmes (Hallée et al., 2018). Chez *T. gondii*, la *TgTFP1* pour *Transporter family protein 1* est indispensable non seulement à la biogénèse des micronèmes mais aussi à leur excrétion (Hammoudi et al., 2018). La biogénèse des micronèmes est aussi fortement dépendante de la clathrine (Pieperhoff et al., 2013) et d'autres facteurs qui probablement agissent ensemble puisque l'absence de l'un des facteurs empêche la biogénèse des organites. Ainsi en plus de *TgSORT*, la biosynthèse accrue des micronèmes est liée à la protéine *TgRNG2* de l'apex de *T. gondii* (Dubois et Soldati-Favre, 2019) donc une baisse de la production des micronèmes est liée au faible niveau de *TgRNG2* chez les parasites (Collins et al., 2013).

III-2 Biogénèse des rhoptries

Tout comme les micronèmes, la biogénèse des rhoptries débute au moment de la réplication parasitaire et a lieu au niveau du point apical chez les parasites (Paredes-Santos et al., 2012). L'invasion et le parasitisme intracellulaire chez les *Apicomplexa* sont entre autre l'œuvre des rhoptries (Boothroyd et Dubremetz, 2008). Les protéines des rhoptries sont indispensables pour la biogénèse dudit organite qui passe par des précurseurs appelés pré-rhoptries issues de la fusion des vésicules d'origine golgienne et deviennent mature suite à l'élongation du pédoncule des rhoptries (Dubremetz, 2007). Chez *T. gondii* comme chez son homologue *P. falciparum*, cette biogénèse des rhoptries nécessite l'acheminement des protéines des rhoptries du Golgi vers ELC par la sortiline (*TgSORT* et *PfSORT* respectif) (Sloves et al., 2012) ; (Hallée et al., 2018). L'interruption de l'expression de ces deux récepteurs chez les parasites a entraîné une absence des rhoptries chez *T. gondii* (Sloves et al., 2012), alors que chez *P. falciparum*, il s'ensuit une accumulation des protéines des rhoptries au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (Hallée et al., 2018). *TgTFP 2-3* de *T. gondii* sont reconnues comme deux autres facteurs spécifiques de la biogénèse et la libération des rhoptries et leur invalidation implique une forte déformation de l'organite chez le parasite (Hammoudi et al., 2018). L'invalidation du gène de *VPS11*, une sous unité à la fois du complexe CORVET (*Class C Core Vacuole / Endosome Transport*) et de HOPS (*Homotypic Vacuole Fusion and Protein*

Sorting) a délocalisé la protéine Rab7 et a donc affecté la biogénèse de ces trois organites (Morlon-Guyot et al., 2015). Chez *T. gondii*, les protéines TgCA-RPs (Carbonic anhydrase-related proteins) identifiées au niveau de la bulbe des rhoptries matures et à la membrane externe des rhoptries néoformées jouent un rôle crucial dans cette biogénèse, la morphologie de l'organite ainsi que sa maturation conditionnent la virulence du parasite (Chasen et al., 2017). La localisation précise au niveau apical et la concentration des rhoptries dépendent de la myosine-F et de la protéine ARO (Armadillo Repeats Only Protein) (Mueller et al., 2013) ; (Beck et al., 2013) ; (Mueller et al., 2016). Au cours de la biogénèse des rhoptries, TgARO (*Palmitoylated Armadillo Repeat Protein*) est recrutée par la protéine TgDHHC7 (*Palmitoyl acyl transferase*) identifiée dans les rhoptries (Beck et al., 2013). Après son recrutement, la protéine TgARO interagit avec les protéines TgAC β (*Adenylate cyclase β*) et TgAIP (*ARO interacting protein*) de la surface des rhoptries, favorisant ainsi la disposition des rhoptries à l'apex des parasites (Mueller et al., 2016).

III-3 Biogénèse des granules denses

La biogénèse des granules denses (GD) est moins élucidée chez *T. gondii* malgré l'évolution de la microscopie électronique et fait intervenir probablement plusieurs protéines mais très peu connues jusqu'à présent (Griffith et al., 2022). La production des granules denses se déroule de façon latérale au niveau de l'IMC (Paredes-Santos et al., 2012) et aussi au niveau de TGN (*Trans-Golgi Network*) et est dépendante de la clathrine localisée au niveau du TGN (Pieperhoff et al. 2013). En plus des protéines GRAs des granules denses qui sont indispensables à la formation de l'organite, plusieurs protéines VPS sont aussi identifiées comme étant des facteurs clés qui y participent chez *T. gondii*. C'est le cas des protéines TgVPS9, TgVps11 et TgVps35 (Morlon-Guyot et al., 2015) ; (Sakura et al., 2016) ; (Sangaré et al., 2016). TgVPS11 interagit avec le Golgi et la vacuole et l'inactivation du gène de TgVPS11 a empêché la biogénèse des granules denses chez *T. gondii* (Morlon-Guyot et al., 2015). Après leur formation, les granules denses établissent une liaison avec le complexe moteur actine myosine F qui facilite leur distribution dans le cytoplasme du parasite (Heaslip et al., 2016).

IV-Composition et fonctionnement du glideosome lors de l'invasion de la cellule hôte

Les *Apicomplexa* doivent leur motilité par "gliding" au complexe protéique appelé "glideosome", une motilité lors de laquelle interviennent les protéines des micronèmes et d'autres facteurs favorisant l'envahissement de la cellule hôte (Opitz et Soldati, 2002). Dans ce complexe multiprotéique se trouvent les protéines cytosoliques à savoir le complexe Myosine A (TgMyoA) et la chaîne légère de Myosine (TgMLC1) (Bergman et al., 2003) ; (Herm-Götz

et al., 2002), des glycoprotéines intégrales de la membrane interne : *TgGAP50*, *TgGAP45*, *TgGAP40* pour protéine associée au glideosome (GAP) (Gaskins et al. 2004) ; (Frénal et al. 2010) et le complexe aldolase-actine-F et la protéine *TgMIC2* de *T. gondii* (Figure 9) (Keeley et Soldati, 2004). Dans ce complexe, ces protéines interagissent directement entre elles ou soit par le biais des protéines intermédiaires. Ainsi dans le cytosol, le complexe *TgMyoA-TgMLC1* auquel sont liés les filaments d'actine-F pour former l'actomyosine est fixé sur ces récepteurs *TgGAP50* et *TgGAP45* de l'IMC (Gaskins et al., 2004). L'actomyosine interagit ensuite avec le complexe *TgMIC2-TgM2AP* de la membrane plasmique de *T. gondii* par le biais d'aldolase cytoplasmique (Jewett et Sibley, 2003) ; (Gaskins et al., 2004). *TgMyoA* du complexe actomyosine assure donc la translocation du parasite grâce aux filaments d'actine liés au *TgMIC2-TgM2AP* des micronèmes vers la cellule hôte, puisque le complexe membranaire *TgMIC2-TgM2AP* est connecté aux récepteurs de l'hôte (Keeley et Soldati, 2004) ; (Huynh et Carruthers, 2006).

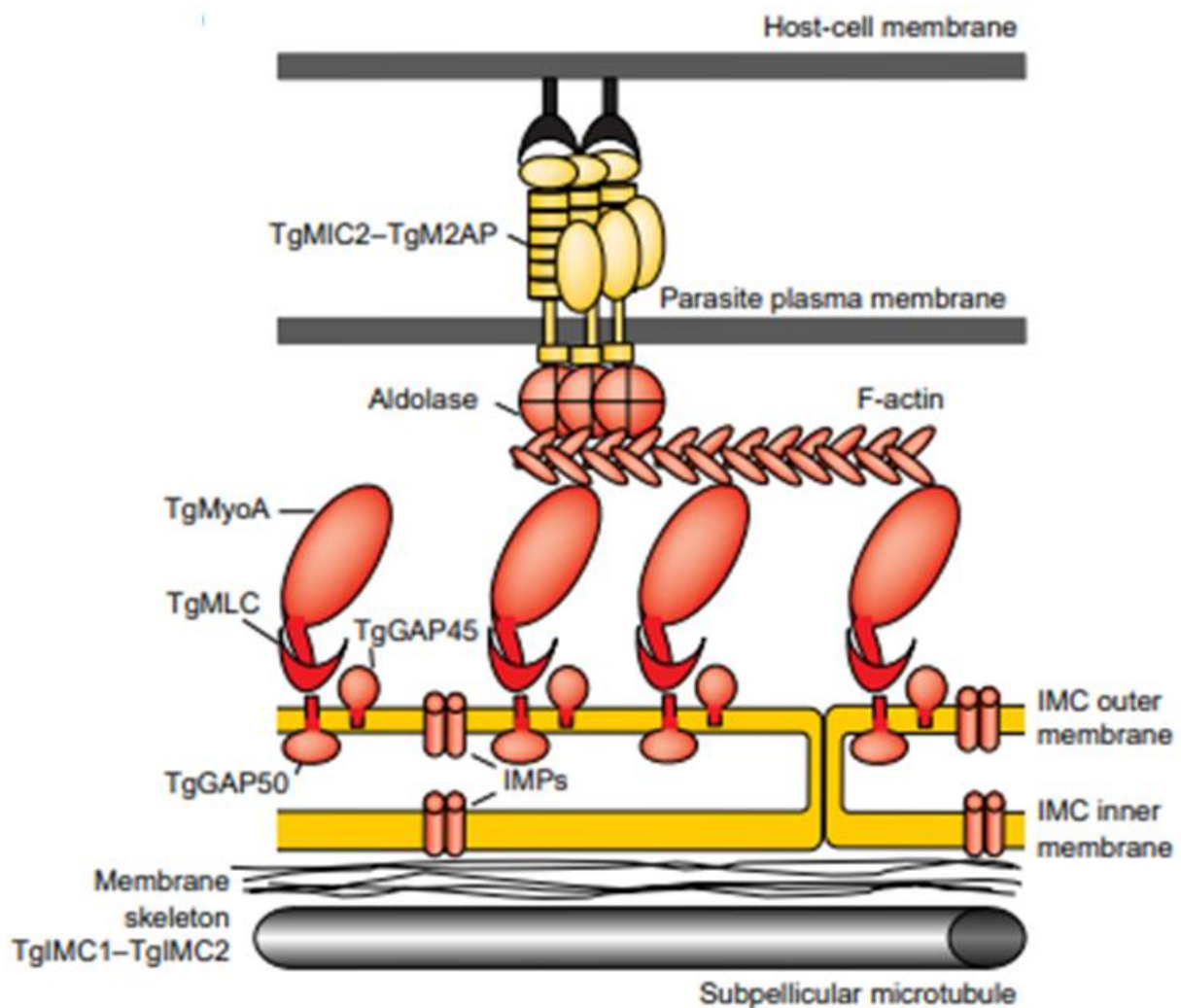


Figure 9 : Schéma de la machinerie moléculaire (glideosome) impliquée dans la motilité de *T. gondii* lors de l'invasion de la cellule hôte (Keeley et Soldati, 2004).

V-Phénomène d'invasion de la cellule hôte par *T. gondii* et les différentes protéines impliquées

Le phénomène d'invasion de la cellule hôte par *T. gondii* est très rapide et est initié par le contact entre le parasite et la cible (Hiroshi et al., 1995). Elle se déroule en plusieurs étapes (Figure 11) et nécessite la coopération de plusieurs facteurs aussi bien d'origine parasitaire que de la cellule hôte.

V-1 Liaison de *T. gondii* à la membrane plasmique de l'hôte

T. gondii s'attache aux récepteurs membranaires de la cellule hôte grâce à son antigène de surface SAGs (Carruthers et Boothroyd, 2007). A ce stade, les micronèmes commencent à libérer la protéine AMA1 (*Apical Membrane Antigen*) qui s'associe aux protéines RON pour donner le complexe AMA1-RON que le parasite va insérer plus tard dans la membrane plasmique de la cellule hôte à partir de la jonction mobile (JM) (Mital *et al.*, 2005) ; (Besteiro *et al.*, 2008) (Figure 10). En plus de son domaine transmembranaire, l'AMA1 contient une courte queue cytoplasmique conservée qui permet au parasite *T. gondii* de percevoir son contact avec la cellule hôte, ce qui déclenche ainsi la libération des rhoptries et l'activation de l'actomyosine, le moteur d'invasion (Mital et al., 2005) ; (Leykauf et al., 2010).

V-2 Orientation du pôle apical de *T. gondii*

Après avoir établi le contact avec la cellule hôte, le parasite réoriente son pôle apical face à la membrane plasmique de la cible (Carruthers et Boothroyd, 2007). A cette étape, le glidéosome, un complexe moléculaire sous membranaire se forme à partir des protéines des micronèmes et du moteur de type myosine qui dépend de l'actine (complexe actine-myosine) (Opitz et Soldati, 2002). Grâce au glidéosome, le parasite entre de façon active dans la cellule hôte à travers la jonction mobile, par invagination membranaire de l'hôte (Carruthers et Boothroyd, 2007). Au cours de l'invagination, les lipides membranaires de l'hôte situés au niveau de la jonction mobile (JM) sont envoyés dans la vacuole parasitophore (VP) en cours de formation (Mordue et al., 1999).

V-3 Mise en place de la jonction mobile

La jonction mobile (JM) est la structure d'ancrage pour le processus d'invasion et se forme au point de l'invasion (c'est-à-dire la zone de contact entre l'apex du parasite et la surface de la membrane plasmique de la cible) à partir du complexe macromoléculaire (RON2/4/5/8) des rhoptries au niveau de la membrane plasmique de la cellule hôte (Lamarque *et al.*, 2011) ;

(Besteiro *et al.*, 2008) ; (Opitz et Soldati, 2002). Lors de l'invasion, la protéine AMA1 sécrétée à la surface du parasite par les micronèmes fixe le complexe macromoléculaire de la jonction mobile en s'associant directement à la protéine RON2 qui lui sert de récepteur (Lamarque *et al.*, 2011). Le complexe MIC2/M2AP se déplace avec la jonction mobile vers le pôle postérieur du parasite (Carruthers, 1999) ; (Vern B. Carruthers, 2002) pour se connecter à la cellule hôte. Lors de l'invagination le parasite sécrète des protéines du bulbe des rhoptries (ROP) et des granules denses qui s'ancrent dans la vacuole parasitophore naissante ou dans le cytoplasme de la cellule hôte (Figure 10) et qui modulent la réponse immunitaire. Au niveau de la jonction mobile, *T. gondii* exclut sélectivement les protéines transmembranaires de la cellule hôte par un mécanisme qui dépend de leur ancrage dans la membrane, en créant ainsi un compartiment non-fusogène : la vacuole parasitophore (VP) (Mordue *et al.*, 1999).

V-4 Mise en place de la vacuole parasitophore et sa membrane

La vacuole parasitophore (VP) constitue une niche qui héberge le parasite au sein de la cellule hôte et dans laquelle il se divise. Elle est une association du plasmalemme de l'hôte associé aux facteurs de virulences sécrétés par le parasite pendant l'invasion (Dubremetz, 1998). Aussi rapide qu'elle soit, la formation de la vacuole parasitophore dure environ 1 à 2 minutes maximum (Carruthers et Boothroyd, 2007). *T. gondii* distend la membrane de la cellule hôte lors de son invagination conduisant ainsi à cette structure membranaire cytoplasmique qui enveloppe le parasite à l'intérieur de la cellule hôte (Dobrowolski et Sibley, 1996). La VP est caractérisée par l'absence de facteurs de régulation clés (Rab5 et NSF) de la fusion endocyttaire, du contenu des vacuoles endocytaires classiques (LAMP) et ne contient aucune protéine de surface comme : ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule 1), récepteur aux facteurs de croissance (FC), molécules du CMH de classe I ou II, CD44, ATPase, ce qui semble donc la protéger entièrement de la machinerie de dégradation de la cellule hôte (Travier, 2007). Ainsi, une fois l'invasion achevée, le parasite commence à se diviser activement dans la vacuole parasitophore à l'abri de la réponse immunitaire, et de la fusion avec les endosomes et lysosomes de la cellule hôte (Mordue et Sibley, 1997) ; (Alan *et al.*, 2015). Cette niche parasitaire est délimitée par une membrane appelée membrane de la vacuole parasitophore (MVP). La MVP néoformée pourrait être une association ultime de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique (RE) de la cellule hôte (Magno *et al.*, 2005) ; (de Souza, 2005) ; (Sinai *et al.*, 1997) avant d'être rapidement modifiée par les protéines des rhoptries (ROP) et des granules denses libérées par le parasite (Carruthers, 1999) ; (de Souza, 2005). La MVP sert de station de triage et de piégeage actif des nutriments dont les lipides provenant de la cellule hôte (Sinai, 2008). Elle constitue ainsi l'interface physique entre les parasites-VP et la cellule hôte

en restant intacte durant toute la procédure de développement intracellulaire des parasites jusqu'à leur sortie (Gold *et al.*, 2015). Au sein de la VP se trouve le réseau intra vacuolaire dont la genèse est assurée par GRA2 et GRA6 (Travier *et al.*, 2008) ; (Mercier *et al.*, 2002) et qui est caractérisé par plusieurs tubules à travers lesquels se font les différents échanges entre l'intérieur et l'extérieur (Sibley *et al.*, 1995).

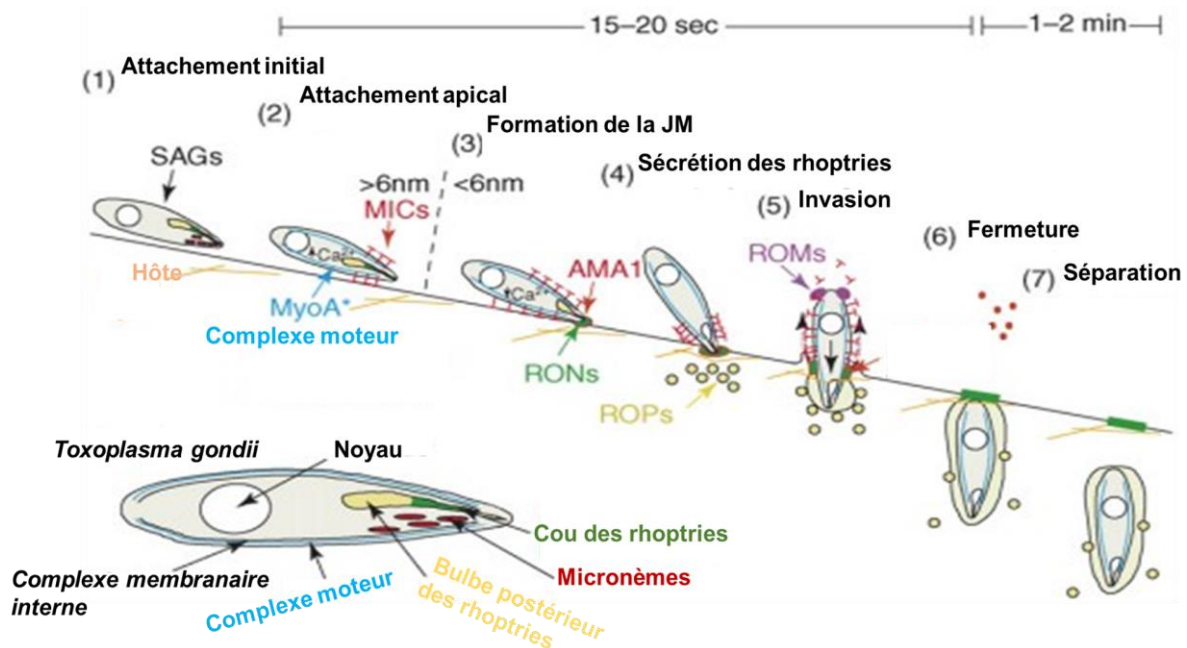


Figure 10 : Modèle du processus d'invasion de la cellule hôte par *T. gondii*. **1)** Début de l'attachement du parasite à la cellule hôte, ce qui implique une reconnaissance des récepteurs de surface cellulaire par les protéines de surface SAGs. **2)** sécrétion et accumulation des protéines MICs (les formes T en rouge) à la surface et à l'apex de *T. gondii* en réponse au flux de Ca^{2+} pour attacher ce dernier à la cellule hôte. **3)** S'en suit la formation de la JM (vert et anneau rouge) grâce à des protéines RON (vert) des rhoptries liées à l'AMA1 (cercles rouges) des micronèmes : il s'agit d'une interface d'interaction intime sous forme de petits anneaux (< 6 nm) que le parasite crée avec la membrane de l'hôte. **4)** A travers le site d'invasion, les protéines ROPs (jaune) des rhoptries sont sécrétées dans le cytoplasme de l'hôte. **5)** S'en suit la pénétration active du parasite à l'intérieur de la cellule hôte (flèches latérales) avec propulsion des MICs transmembranaires et/ou l'anneau AMA1-RON vers la zone postérieure de *T. gondii* qui invagine la membrane de la cellule hôte pour former la VP. Il semble qu'une ou plusieurs protéases rhomboïdes ROMs (violet) sont responsables de l'excrétion des MICs à l'extrémité postérieure du parasite. **6-7)** constituent la fin de la formation de la VP et son détachement de la membrane plasmique de la cellule hôte grâce aux protéines parasitaire et de la cellule hôte (Carruthers et Boothroyd, 2007).

VI-Acquisition des nutriments et division de *T. gondii* au sein de la cellule hôte par endodyogénie

VI-1 Acquisition des nutriments par *T. gondii*

La propriété intracellulaire obligatoire de *T. gondii* lui permet de compenser certaines fonctions métaboliques dont il est dépourvu au détriment de la cellule hôte infectée. En effet, *T. gondii* possède très peu de gènes impliqués dans les voies métaboliques et il dispose des stratégies encore peu connues pour détourner les nutriments de la cellule hôte infectée indispensable à sa survie et pour sa multiplication (Coppens, 2014). Grâce aux minuscules pores de la MVP, *T. gondii* transporte les éléments nutritifs essentiels (dont la taille ne dépasse pas 1900 Da) de la cellule hôte ou de son environnement auxquels il est auxotrophe ou non à l'intérieur de la VP (Schwab et al., 1994). La protéine ROP14 des rhoptries serait impliquée dans la formation de ces pores indispensables aux transferts de ces molécules, compte tenu de ses multiples domaines transmembranaires (El Ajj et al., 2006). Chez *T. gondii*, comme chez tout autre protozoaire, peu de protéines parasitaires spécifiques à ces transports de nutriments au profit des parasites sont connues (Dean et al., 2014). Il a été montré que les protéines GRA17 et GRA23 sont logées au niveau de ces pores de la MVP et facilitent donc le transfert moléculaire entre *T. gondii* et l'hôte infecté (Gold et al., 2015). Grâce aux protéines transporteurs d'adénosines *TgATs* et *TgNBT1*, les tachyzoïtes de *T. gondii* importent dans la VP de l'adénine, inosine, guanine, xanthine et hypoxanthine auxquels ils sont auxotrophes (De Koning et al., 2003) ; (Chiang et al., 1999). Le parasite est également auxotrophe pour les polyamines (Cook et al., 2007) et aux acides aminés tels que la tyrosine (Marino et Boothroyd, 2017), l'arginine (Fox et al., 2004) et le tryptophane (Pfefferkorn, 1984) impliqués dans la biogénèse des macromolécules, le métabolisme ainsi que la multiplication cellulaire (Wallace, 2003) (Figure11). Les *Apicomplexa* possèdent des transporteurs d'acide aminés nommés *ApiAT*. Chez *T. gondii*, ces protéines *TgApiATs* sont situées au niveau de la pellicule des parasites et le transfert de la tyrosine est assuré par *TgApiAT5-3* (Wallbank et al., 2018) alors que celui de l'arginine est réalisé par *TgApiAT1* (Rajendran et al., 2017). *P. falciparum* possède quatre protéines *PfApiATs* qui sont aussi essentielles pour la réplication asexuelle du parasite (Wichers et al., 2021). Une fois dans le cytoplasme de *T. gondii*, l'arginine est ensuite transformé en citrulline et carbamoyl phosphate par le biais de l'arginine dihydrolase pour produire enfin de l'énergie sous forme de l'ATP grâce au carbamate kinase (Cook et al., 2007).

Outre ces éléments nutritifs, *T. gondii* utilise les lipides qui sont indispensables pour la formation de la VP ainsi que de la MVP, la biogénèse de la pellicule et aussi pour la réplication des tachyzoïtes (Charron et Sibley, 2002). Chez le parasite, les lipides représentent

d'importantes sources de composées pour la biogénèse du réseau intravasculaire (IVN) (Caffaro et Boothroyd, 2011). *T. gondii* est capable de synthétiser une bonne partie de ses lipides en occurrence les phospholipides mais à partir des précurseurs lipidiques que le parasite obtient de l'hôte infecté (Charron et Sibley, 2002) ; (Ren et al., 2020) ; (Dubois *et al.*, 2018) et le reste des lipides est obtenue directement de l'hôte infecté (Dubois et al., 2018). Chez *T. gondii*, comme chez les autres *Apicomplexa*, les phospholipides sont plus concentrés à la pellicule et représentent environ 80 à 90% de la totalité des lipides chez ces organismes (Welti et al., 2007). En présence du cytidine diphosphate-diacylglycerol (CDP-DAGs) endogène (Kong et al., 2017) et du précurseur myo-inositol exogène, *T. gondii* produit la phosphatidylinositol (PI) sous l'action de PI synthase dans le Golgi (PIS) (Ren *et al.*, 2020) ; (Gardocki et al., 2005) ; (Kong et al., 2017) (Figure 12). La phosphatidylsérine (PS) est produit par le parasite dans le RE à partir de la sérine exogène en présence de la PS synthase (Gupta et al., 2005) ; (Arroyo-Olarte et al., 2015). Quant à la phosphatidyléthanolamine (PE), elle est produite par le parasite dans le RE, dans la mitochondrie et aussi dans la VP. Ainsi dans le RE, la PE est issue de la fusion de cytidine diphosphate (CDP)-éthanolamine exogène et du diacylglycérol (DAG) (Hartmann *et al.*, 2014). Pendant ce temps, sous l'action des granules denses, *T. gondii* synthétise dans la VP phosphatidylsérine décarboxylase (*TgPSD1pv*), une enzyme très soluble et également synthétisée dans la mitochondrie (*TgPSD1mt*) qui lui permet de décarboxyler PS pour conduire à la PE (Gupta et al., 2012) ; (Hartmann et al., 2014). La synthèse de la phosphatidylthréonine (PT) est indépendante de tout précurseur de l'hôte et s'obtient uniquement à partir de la thréonine endogène en présence de PT synthase (PTS) dans le RE (Arroyo-Olarte et al., 2015). De plus, *T. gondii* détourne le cholestérol par séquestration du lysosome de l'hôte infecté (Coppens et al., 2000), l'acide oléique et autre gouttelette lipidique de l'hôte qui sont indispensables aussi bien pour la virulence que pour la survie du parasite (Hu et al., 2017) ; (Nolan et al., 2017). L'excès lipidique étant nuisible au parasite, celui-ci assure le stockage de l'excès lipidique dans son cytoplasme mais sous forme de triacylglycéride (Hu et al., 2017).

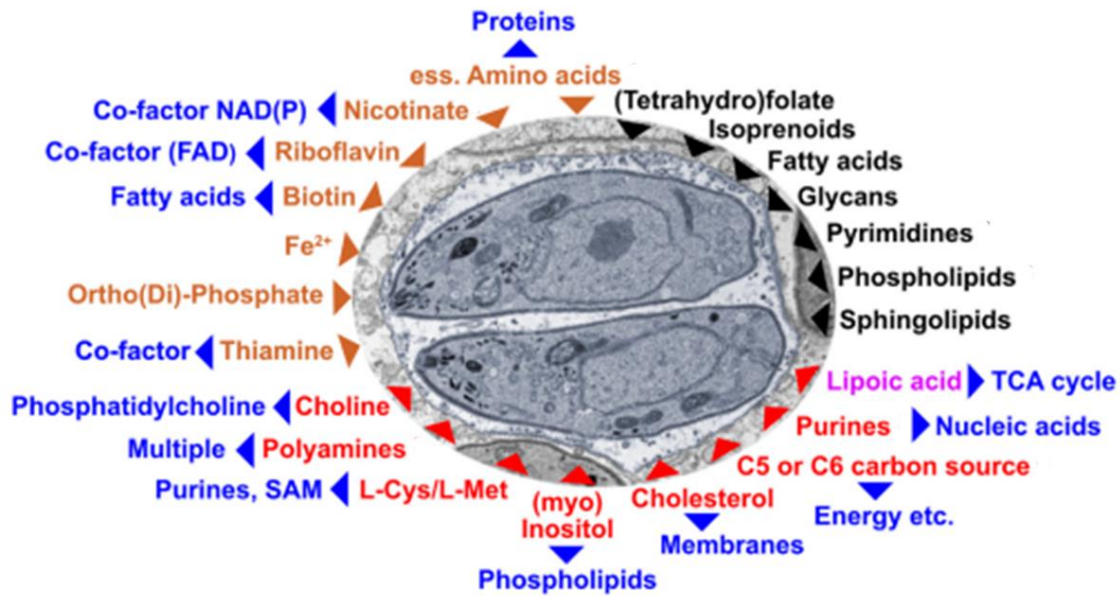


Figure 11 : Dépendance nutritionnelle connue ou prédicte de *T. gondii* vis-à-vis de la cellule de mammifère infectée (Blume et Seeber, 2018).

- ▶ Absorption des métabolites synthétisés par la cellule du mammifère
- ▶ Absorption compétitive des composés auxotrophes à la fois pour *T. gondii* et l'hôte
- ▶ Composés plus ou moins essentiels et détournés par le parasite
- ▶ Absorption des produits synthétisés par le parasite à partir des métabolites piégés

VI-2 Division de *T. gondii* au sein de la cellule hôte par endodyogénie

Une fois au sein de la cellule hôte, *T. gondii* dépourvu de son pouvoir de mobilité est à présent soumis à la réplication par un mode particulier appelé endodyogénie, contrairement à la plupart des parasites *Apicomplexa* qui se multiplient par schizogonie. L'endodyogénie est caractérisée par la formation de deux cellules filles au sein de la mère. En effet, la maturation des cellules filles néoformées évolue avec la répartition équitable des organites cytoplasmiques majeurs de la mère, ce qui s'achève avec la disparition complète de celle-ci. Tout débute par la réplication de l'appareil de Golgi de la cellule-mère fournissant ainsi une base moléculaire à la formation de l'IMC qui entoure les cellules filles en cours de formation (Agop-Nersesian et al., 2010). Il s'en suit instantanément la division binaire du noyau mère (Jadin et al., 1967). La duplication de l'apicoplaste de la cellule-mère avec tous ses contenus est suivie par celles de la mitochondrie et du RE au bénéfice de chaque cellule fille (Martins-Duarte et al., 2021) ; (Dubey et al., 1998) ; (Nishi et al., 2008). A ce niveau débute la formation des rhoptries et des micronèmes par chacune des cellules néoformées et leur positionnement au niveau du pôle

apical, comme chez la mère (Nishi et al., 2008). Pendant l'endodyogénie, il y a également une production accrue des lipides membranaires en l'occurrence les phospholipides qui contribuent fortement entre autres à la modélisation de la membrane plasmique du parasite.

VII- Trafic intracellulaire chez les *Apicomplexa* et les facteurs impliqués : cas de *T.*

gondii

Chez les organismes eucaryotes évolués, le trafic intracellulaire protéique est caractérisé par plusieurs modèles tels que : le transport vésiculaire qui constitue le plus fréquent mode de transport adopté au niveau des organites membranaires (Bisio et al., 2020), le transport par diffusion et le transport à travers la membrane du nucléole (Mironov et Beznoussenko, 2019). En respectant les mêmes principes basés sur la dissociation, la progression et la libération, ces différents modes de trafics intracellulaires permettent la communication entre les différents organites subcellulaires en maintenant intact l'intégrité cellulaire et l'équilibre de l'organisme (Mironov et Beznoussenko, 2019) ; (Szul et Sztul, 2011). Chez les parasites *Apicomplexa* dont *T. gondii* et *P. falciparum*, le trafic des protéines MICs, ROPs et GRAs est indispensable à la biogénèse et à la sécrétion des trois organites spécifiques et implique plusieurs facteurs. Le trafic intracellulaire protéique dépend non seulement du type de protéine, de sa localisation et de sa destination mais aussi de la composition du système de la machinerie à la fois du RE, de l'appareil de Golgi et des endosomes chez les cellules eucaryotes (Hammoudi et al., 2018).

VII-1 Transport antérograde des protéines

VII-1-1 Translocation protéique dans le réticulum endoplasmique

Chez les eucaryotes, y compris les *Apicomplexa* dont *T. gondii*, les protéines naissantes au niveau du ribosome sont transloquées dans le RE au cours de leur traduction suite à l'ancrage ribosomique à la membrane du RE par le biais du récepteur protéique SRP (Signal Recognition Particle) qui assure la connexion du complexe RE-ribosome-peptides (Schwarz et Blower, 2016). Ce récepteur protéique présente chez les mammifères est conservé chez *T. gondii* et chez *P. falciparum* comme chez les autres *Apicomplexa* (Sheiner et Soldati-Favre, 2008). Chez la levure comme chez les mammifères, il a été démontré que plusieurs protéines en cours de synthèse sont ainsi directement transloquées dans la zone luminale du RE (Jan et al., 2014). Chez les bactéries les facteurs d'attaches (protéines secs) (présentes aussi chez les *Apicomplexa*) (Bisio et al., 2020) assurent l'ouverture des pores membranaires du RE permettant ainsi l'entrée des protéines et d'autres vésicules dans le RE (Rapoport, 2007). Certaines de ces protéines sont retenues aux niveaux de la membrane du RE lorsqu'elles possèdent des domaines transmembranaires (von Heijne, 2006) ; (Fagone et Jackowski, 2009).

VII-1-2 Transport des protéines du RE vers l'appareil de Golgi

Le système endomembranaire cytosolique de *T. gondii* est représenté par le RE, le Golgi, l'ELC et le compartiment vacuolaire (VAC) similaire à la vacuole végétale (Marek Elias, 2010), (Fagone et Jackowski, 2009). Il s'agit du siège de synthèse des phospholipides majeurs et en même temps une zone où s'effectuent d'important trafic protéique par le biais des vésicules qui s'enroulent autour des protéines à transporter chez les *Apicomplexa* comme chez toute cellule eucaryote. Les vésicules cellulaires sont entre autres constituées des complexes protéiques COPI et COPII (coatomer protein) très conservés chez *T. gondii* comme chez les autres parasites *Apicomplexa* dont *P. falciparum*, pour faciliter les échanges protéiques dans les deux sens (Kibria et al., 2019). Le complexe COPII est un assemblage de SAR1 à laquelle s'associe des hétérodimères de SEC23/24p et de SEC13/31p (Figure 12A) en liaison avec les petites protéines G aussi bien connues chez *T. gondii* que chez *P. falciparum* (Fath et al., 2007) ; (Kibria et al., 2019). Le facteur d'échange de nucléotide guanine (GEF) stimule la sous unité GTPase-SAR1 lié à la membrane du RE, attirant les SECs de COPII auxquelles sont attachées les cargaisons protéiques (Saito et Katada, 2015). Le complexe COPII représente un accumulateur de facteur de trafic et est exclusivement impliqué dans le transport antérograde des cargaisons protéiques du site extérieur du RE (ERES) pour assurer leur transport jusqu'au Golgi et du TGN (*Trans-Golgi network*) (Saito et Katada, 2015) ; (Szul et Sztul, 2011) ; (Hughes et Stephens, 2008) ; (McCaughy et al., 2018). La décharge des protéines transportées résulte de la fusion de COPII avec l'organite receveur en occurrence l'appareil de Golgi (van et al., 2010).

La protéine SLY1 (*SH3 containing Lymphocyte Protein*) présente chez les eucaryotes (Reis et al., 2009) est indispensable à la formation du complexe transmembranaire SNARE en fixant de façon spécifique les protéines Sed5p et Ufe1p de la levure et aussi STX5-18 des vertébrés (Yamaguchi et al., 2002) ; (Demircioglu et al., 2014). Identifiée aussi chez la levure, la protéine SLY1 de *T. gondii* (*TgSLY1*) comme celle de *P. falciparum* (*PfSLY1*) est spécifiquement active dans l'exportation des protéines MIC2 et GRA1 du RE vers Golgi (Demircioglu et al., 2014). Chez *T. gondii*, une dégradation de *TgSLY1* par protéasome explique l'absence de MIC2 et GRA1 dans les micronèmes et granules denses respectifs (Bisio et al., 2020).

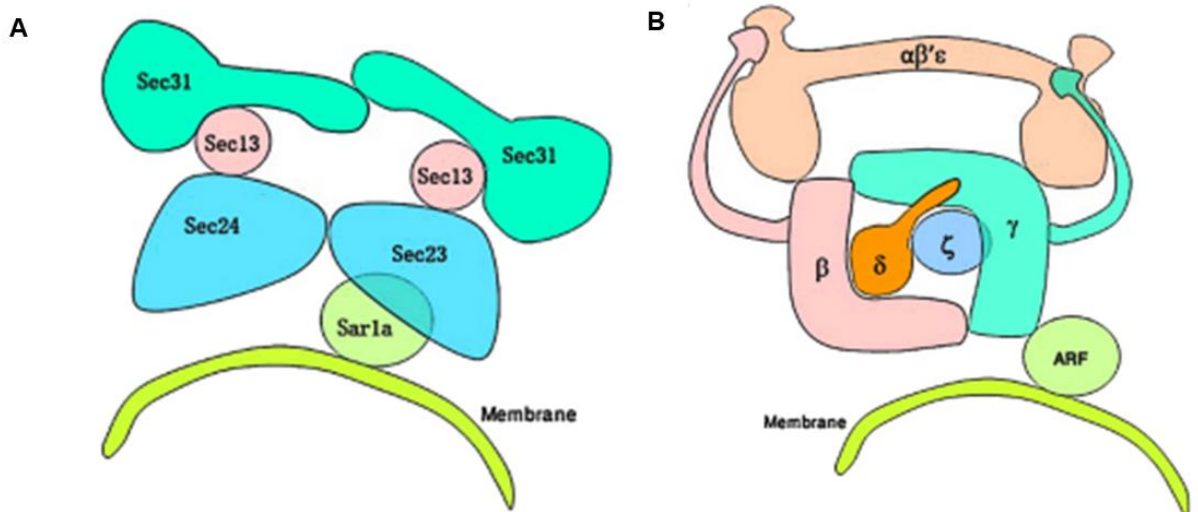


Figure 12 : Composition protéique des vésicules COPI et COPII (Kibria et al., 2019).

A : les sous-unités SECs et SAR1A de COPII en interaction avec la membrane

B : les différentes sous-unités de COPI liées au ARF fixée à la membrane

VII-1-3 Transport des protéines de l'appareil de Golgi vers l'ELC

Les facteurs clés indispensables au trafic antérograde des protéines chez *T. gondii* sont entre autres *TgSORT*, *TgDrpB* (Dynamain-Related Protein B), *TgMon1* et le complexe HOPS/CORVET, *TgVSP* (Vacuolar Protein Sorting-associated Proteins), *TgAP1* (*Adaptor Protein 1*) (Sloves et al., 2012) ; (Breinich et al. 2009) ; (Morlon-Guyot et al., 2015) ; (Sangaré et al., 2016). Chez les *Apicomplexa*, les protéines ROPs/RONs et MICs sont les seules des organites sécrétoires spécifiques qui traversent l'ELC avant de parvenir respectivement aux rhoptries et aux micronèmes (Sheiner et Soldati-Favre, 2008) ; (Tomavo et al., 2013). La protéine *TgSORT* est identifiée chez *T. gondii* comme étant l'unique récepteur crucial qui assure à la fois le passage des protéines ROPs/RONs et MICs de l'appareil de Golgi vers l'ELC (Sloves et al., 2012). Il a été démontré à la suite de l'inactivation de *TgSORT* par la technique de Knock Out inducible à l'ATc, que le transport des protéines a été perturbé, ce qui se traduit par leur présence aussi bien dans l'espace vacuolaire que dans le cytoplasme de la cellule hôte. Cela a pour conséquence le blocage de la biogénèse des organites apicaux tels que les rhoptries et les micronèmes (Sloves et al., 2012). La protéine AP1 présente chez les mammifères et qui est fortement impliquée dans le tri des vésicules à partir du TGN (Trans-Golgi-Network) vers la MP des cellules épithéliales (Bonifacino, 2014) est aussi identifiée chez *T. gondii* et interagit avec le domaine C-terminal de *TgSORT* (Sloves et al., 2012). Les protéines ROPs renferment du côté C-terminal des résidus leucines et tyrosines interagissent avec la sous unité μ de *TgAP1* pour faciliter leur trafic du TGN vers l'ELC (Hoppe et al., 2000) ; (Ngô et al., 2003). De plus

il a été montré qu'une mutation de *TgAPμ1* provoque la libération des pro-ROPs dans la VP et une condensation de ROP2 au niveau du post-Golgi, ce qui a par conséquent affecté exclusivement la biogénèse des rhoptries (Ngô et al., 2003) ; (Venugopal et al., 2017).

S'agissant du trafic des protéines MICs vers les micronèmes, cela dépend essentiellement du domaine propeptide situé du côté N-terminal que contiennent les protéines. Lors du transport des MICs, (pro ou mature) le domaine propeptide est clivé facilitant ainsi le trafic chez *T. gondii* (Harper et al., 2006). La suppression du domaine N-terminal des protéines M2AP et de MIC5 a empêché leur transport vers les micronèmes. De plus, il a été montré que seuls les acides aminés valine en position 3 et la leucine à la position 1 dans le domaine propeptide sont à l'origine du clivage respectivement de Pro-M2AP et Pro-MIC5, ce qui est pareil pour MIC3 et AMA1 chez *T. gondii* comme pour MIC5 chez *E. tenella* (Gaji et al., 2011). Grâce au GEF (Epidemal Growth factor) qui favorise la fixation des MICs à la cellule hôte (Cérède et al., 2002), la protéine MIC6 transmembranaire interagit avec MIC1 et MIC4 chez *T. gondii* (Reiss et al., 2001). Dans ce complexe, MIC1 à laquelle est liée MIC4, assure le repliement de MIC6 qui favorise le transport des trois protéines du Golgi vers les micronèmes (Reiss et al., 2001) ; (Saouros et al., 2005). De même l'acheminement de M2AP et MIC3 vers les micronèmes dépendent respectivement de leurs partenaires spécifiques transmembranaires MIC2 et MIC8 (Meissner et al., 2002) ; (Huynh et Carruthers, 2006). Le transport inter organite du couple protéique MIC2/M2AP est dû à la présence du motif tyrosine dans MIC2 et du domaine pro peptidique de M2AP (Huynh et Carruthers, 2006) ; (Harper et al., 2006). La présence du motif AC-LL (Acidic Cluster-Dileucine motif) dans le domaine C-terminal de *TgSORT* laisse présumer que le trafic des MICs et ROPs par *TgSORT* dépend aussi de la protéine *TgAP1* (Sloves et al., 2012). Afin de renouveler le transport des protéines MICs et ROPs/RONs, le cargo de récepteur *TgSORT* est recyclé de l'ELC vers le Golgi par le complexe retromère lors du transport rétrograde (Sloves et al., 2012) ; (Sangaré et al., 2016) qui est abordé au point VII-2. La protéine DrpB (dynamamin-related protein B) et la clathrine sont connues comme autres facilitateurs du tri et du trafic des protéines et sont indispensables à la formation des vésicules du TGN (Pieperhoff et al., 2013) ; (Heredero-Bermejo et al., 2019). Le récepteur sortiline est aussi identifiée chez *P. falciparum* et chez les mammifères. Chez *P. falciparum*, la protéine sortiline (*PfSortilin*) est aussi localisée dans le Golgi et est connue pour son rôle de transporteur du complexe protéique RAMA/ RAP1 (Rhoptry-Associated Membrane Antigen / Rhoptry-Associated Protein 1) à partir du Golgi vers les rhoptries au cours de la réplication du parasite (Hallée et al., 2018). En effet, étant soluble, la protéine RAP1 se lie à RAMA afin d'être transportée dans les rhoptries (Richard et al., 2009). La protéine *PfSortilin* est aussi

indispensable à la division du noyau et à la formation des mérozoïtes chez *P. falciparum*. Il a été démontré qu'en absence de *PfSortilin*, le parasite est incapable de se différencier en des mérozoïtes (Hallée et al., 2018).

S'agissant des protéines GRAs, leur mécanisme de transport vers les granules denses est indépendant de *TgAP1* et reste à décrire (Ngô et al., 2003). Ces protéines possèdent un motif TEXEL (*Toxoplasma export element*) qui facilite leur transport, dont l'homologue chez *P. falciparum* est PIXEL (*Plasmodial export element*) et joue le même rôle (Haldar, 2016). La protéine *TgASP5* (*Aspartic protease*) aussi présente chez *P. falciparum* et localisée dans le Golgi, fixe les protéines GRAs du côté N ou C-terminal en clivant ces protéines à partir de leur motif TEXEL (Haldar, 2016) ; (Coffey et al., 2015) ; (Curt-Varesano et al., 2016). C'est le cas de GRA1, GRA2 et GRA3 qui après clivage sont envoyées dans MNN (*Membranous Nanotubular Network*), GRA7, GRA19 et GRA20 qui sont ensuite exportées vers la MVP et enfin GRA16 et GRA24 qui sont directement transportées dans le noyau de l'hôte (Haldar, 2016). Une fois clivée, ces GRAs s'accrochent à certaines protéines chaperonnes GRAs telles que GRA5, GRA6 et GRA45 pour former des complexes (Braun et al., 2008) ; (Wang et al., 2020). Ces complexes qui interagissent directement avec les transporteurs inconnus, permettent l'exportation des protéines à leur destination respectif (Hammoudi et al., 2015) ; (Coffey et al., 2015). Plusieurs facteurs semblent être impliqués dans le trafic des GRAs, c'est le cas de la protéine kinase *TgWNG1* qui assure la phosphorylation des GRAs, facilitant ainsi leur insertion dans la MVP et au sein de l'IVN (*Intravacuolar Network*) (Dewangan et al., 2022). Dans ce processus, la protéine VPS9 est indispensable au tri des GRAs au niveau de l'appareil de Golgi et à leur transport vers les organites (Sakura et al., 2016), ce qui est régulé par la petite protéine G Rab6 (Stedman et al., 2003). La suppression de la protéine *TgASP5* a induit non seulement la disparition de l'IVN mais aussi une forte accumulation des GRAs dans la VP chez *T. gondii* (Hammoudi et al., 2015) ; (Coffey et al., 2015). A l'opposé de cela, chez *P. falciparum*, l'inactivation de *PfASP5* a induit la mort des parasites (Wang et al., 2020).

VII-1-4 Transport des protéines à partir de l'ELC vers l'apex de *T. gondii*

Endosomal like compartment (ELC) est considéré comme le siège central (accepteur et expéditeur) du trafic des protéines aussi bien vers le TGN, la MP, le compartiment vacuolaire (VAC) et aussi les MICs et ROPs/RONs respectivement vers les micronèmes et les rhoptries chez *T. gondii* (Harper et al., 2006) ; (Dacks et al., 2009) ; (Jimenez-Ruiz et al., 2016). Une fois dans l'endosome tardif, les complexes protéiques MICs empruntent la voie des HOPS afin d'être déversées dans VAC pour être par la suite déchargées dans les micronèmes. Les ROPs/RONs de l'endosome précoce sont livrées dans les pro-rhoptries suivant la même voie

des HOPS avant de parvenir aux rhoptries matures (Venugopal et Marion, 2018). La protéine *TgVPS9* (vacuolar protein sorting) localisée au niveau du Golgi et de l'ELC constitue un facteur clé dans la modulation du trafic des protéines MICs et ROPs/ROns dont elle régule la maturation en participant donc à la biogénèse des rhoptries et micronèmes (Sloves et al., 2012) ; (Sakura et al., 2016). Il a été démontré que chez *Caenorhabditis elegans* et la levure, le complexe HOPS assure la fusion de l'endosome tardif et le lysosome par le biais de que Rab7 (Balderhaar et Ungermann, 2013) ; (Delahaye et al., 2014). La protéine *TgVPS11* un composant du complexe HOPS située dans l'ELC est indispensable au tri des protéines ainsi qu'à la biogénèse des micronèmes, rhoptries et granules denses (Morlon-Guyot et al., 2015) ; (Morlon-Guyot et al., 2017). L'interruption du complexe HOPS chez *T. gondii* a induit un blocage de la biogénèse des micronèmes, des rhoptries et aussi des granules denses (Morlon-Guyot et al., 2015). Le mécanisme à travers lequel ces protéines sont toutes transitées de l'ELC au sein des organites spécifiques apicaux est moins connu jusqu'à présent. En effet, la protéine *Stx12* récemment identifiée au niveau de l'ELC participe au trafic des protéines vers les organites apicaux (Bisio et al., 2020), tout comme les protéines TFPs (Transporter Facilitator Proteins) qui sont très conservées chez les *Apicomplexa* (Hammoudi et al., 2018). Chez *T. gondii*, *TgTFP1* située au niveau de l'ELC a été aussi localisée dans les micronèmes alors que *TgTFP2-3* sont identifiées uniquement dans les rhoptries (Hammoudi et al., 2018).

Le succès du tri et du trafic des protéines est aussi l'œuvre des protéines GTPase-Rabs présentes aussi bien dans le complexe TGN et au niveau de l'ELC (Besteiro et al., 2020). Elles assurent la régulation du transport des MICs et ROPs de l'ELC vers les micronèmes et les rhoptries respectifs au pôle apical du parasite (Sloves et al., 2012) ; (Tomavo et al., 2013), (Kremer et al., 2013) ; (Sangaré et al., 2016) ; (Sakura et al., 2016). En effet, le trafic des protéines ROPs/ROns et MICs est régulé par Rab5A et Rab5C et en plus de cela, les protéines par Rab7 et Rab11A interviennent dans le transport des MICs (Kremer et al., 2013) ; (Venugopal et al., 2020) et Rab5A fonctionne en coordination avec *TgAP1* (Venugopal et al., 2017). Il a été démontré que la localisation des protéines de rhoptrie et de certaines protéines des micronèmes est perturbée en absence de Rab5A et Rab5C dans les tachyzoïtes de *T. gondii*. En effet, MIC3 est transportée dans la vacuole parasitophore alors que MIC8 et MIC11 sont transportées dans d'autres compartiments (Kremer et al., 2013).

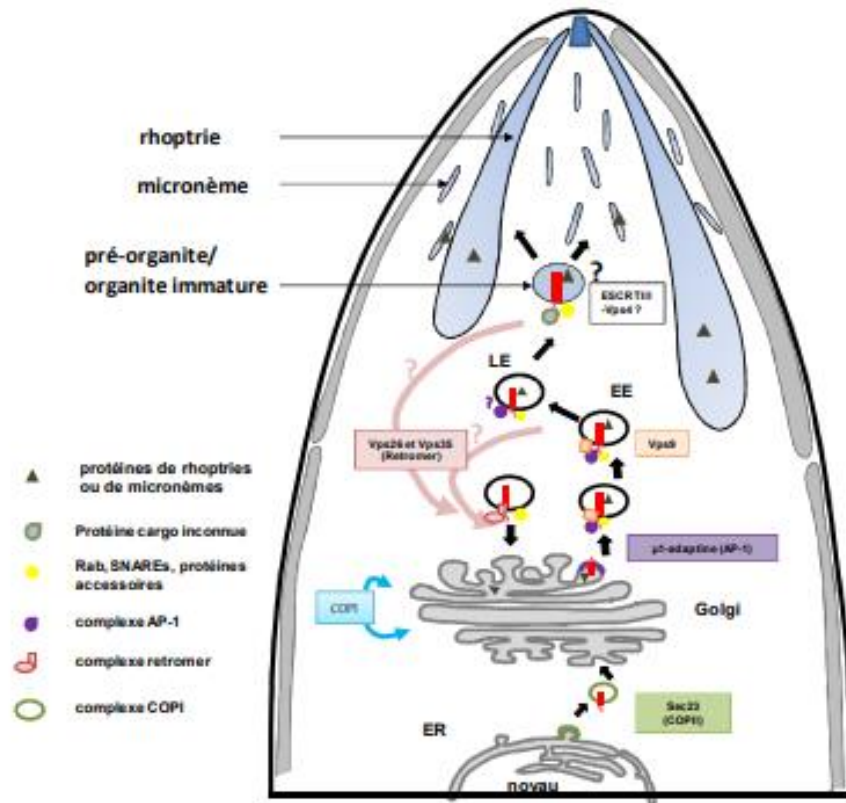


Figure 13 : Schéma représentant le transport intracellulaire des protéines MICs et ROPs associées à *TgSORT* et le recyclage de *TgSORT* chez *T. gondii* (Sloves et al., 2012).

VII-2 Transport rétrograde et recyclage du récepteur cargo

➤ De l'ELC vers l'appareil de Golgi

Le trafic rétrograde et le recyclage se déroulent suivant un même mécanisme et permettent non seulement le maintien de la localisation subcellulaire des récepteurs transmembranaires et des transporteurs du trafic intracellulaire mais aussi favorisent leur réutilisation par la cellule (Klinger et al., 2015). L'ELC est connu pour être le siège de départ des deux processus imbriqués et indispensables au bon fonctionnement des organismes assurés par le complexe retromère et qui s'achèvent dans le TGN et la membrane plasmique (Huotari et Helenius, 2011) ; (Sangaré et al., 2016). Le retromère constitue le moteur d'orchestre de la régulation du tri des protéines et du trafic intracellulaire chez les eucaryotes (Huotari et Helenius, 2011) ; (Burd et Cullen, 2014). Il s'agit d'une couche membranaire qui est constituée de deux sous complexes : le cargo protéique qui rassemble le trimère protéique du tri vacuolaire (VPS35-VPS29-VPS26) très conservées chez les eucaryotes et le dimer protéique SNX1 (VPs5)-SNX2 (VPs17) (Sorting Nexin Proteins) qui représente le second sous complexe connu pour interagir avec la membrane (Seaman et al., 2009) ; (Gokool et al., 2007). En interagissant

avec les membranes, les SNXs assurent la courbure membranaire, indispensable pour décrocher les récepteurs membranaires. En effet, la diversification fonctionnelle du complexe retromérique chez les mammifères est due à une variation du facteur SNXs (Abubakar et al., 2017). Dans ce complexe retromérique, les facteurs SNXs sont directement liés au VPS35 (Harrison et al., 2014) ; (Restrepo et al., 2007) puis interagissent avec le complexe recouvrant les vésicules et la clathrine lors du recyclage membranaire (Huotari et Helenius, 2011). La protéine VPS35 a été reconnue comme l'unité moteur du cargo central du retromer (VPS35-VPS29-VPS26) de reconnaissance des cargaisons protéiques (Huotari et Helenius, 2011). Seuls les domaines cytosoliques des récepteurs à recycler interagissent spécifiquement avec VPS35. Plusieurs protéines concourent à l'intégration du complexe retromérique dans l'ELC chez les eucaryotes lors du trafic rétrograde. Les petites protéines GTPase-Rabs en occurrence Rab5 et Rab7 recrutent le complexe dans l'ELC en interagissant avec VPS26 (Bean et al., 2015) ; (Rojas et al., 2008) ; (Seaman et al., 2009). Ce recrutement dépendant de la phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) est aussi initié par VPS9-GEFs chez la levure (Bean et al., 2015). Le retromère empêche la dégradation des protéines transmembranaire et récepteurs en les recyclant (McGovern et Carruthers, 2016) ; (Abubakar et al., 2017). Ce retour des récepteurs au TGN et à la membrane plasmique est le plus souvent médié par l'action conjointe de plusieurs facteurs et l'intervention de chaque facteur dépend du site de décrochage du récepteur. Les dimères protéiques clathrine-ACAP1 et clathrine-GGA3 initient le recyclage membranaire en interagissant avec des récepteurs auxquels sont couplés des transporteurs de nutriment au niveau de la MP (Figure 14) (Li et al., 2007) ; (Parachoniak et al., 2011) ; (Burd et Cullen, 2014). L'interaction de la clathrine avec AP1, PACS1 et d'EpsinR permet le décrochage des récepteurs des endosomes précoce et tardif qui sont exportés dans le TGN (Shiba et al., 2010) ; (Johannes et Popoff, 2008) ; (Johannes et Wunder, 2011).

Chez *T. gondii*, le recyclage de TgSORT, le récepteur clé indispensable du trafic antérograde (Sloves et al., 2012) est assuré par le retromère (Sangaré et al., 2016). En effet TgVPS35 auquel se lie le domaine cytosolique de TgSORT a été identifiée comme partenaire spécifique de TgSORT du trafic intracellulaire chez *T. gondii* (Sangaré et al., 2016) ; (Sloves et al., 2012). TgSORT dans le trafic des ROPs et MICs vers les endosomes précoce et tardif se fixe au retromer. Il a été démontré que la suppression de TgVPS35 du retromer, par la technique de Knock Out inductible a bloqué le recyclage de TgSORT, qui est donc accumulée dans des vésicules décorées par Rab5 et Rab7 endosomales (Sangaré et al., 2016). De plus, Il a été montré que la déplétion totale de TgVPS35 empêche le retour de TgSORT au niveau TGN (Sangaré et al., 2016), ce qui a donc bloqué le trafic des protéines de ROPs et de MICs (Sloves et al., 2012).

TgVPS35 est indispensable à l'activité rétrograde du complexe retromérique, dont dépend aussi la biogénèse des organites sécrétoires spécifiques qui conditionne la survie de *T. gondii* (Sangaré et al., 2016). Plusieurs récepteurs de type 1 en occurrence sortiline et SorLA des mammifères sont aussi recyclés de l'ELC vers TGN par le retromère au cours du transport rétrograde. Il a été démontré que la sortiline interagit spécifiquement avec SNX1 du dimer du complexe retromère (Klinger et al., 2015). La perturbation du complexe retromère chez la souris affecte le transport rétrograde et a induit des déficits au niveau du lysosome et est aussi lié à la maladie d'Alzheimer chez les mammifères (Tammineni et al., 2017). Chez la levure, le recyclage de VPS10 transporteur de la carboxypeptidase Y (CPY) déchargée dans l'ELC, dépend du complexe retromère lors du trafic rétrograde (Seaman, 2004) ; (Seaman et al., 1998). Ces activités exportatrices du retromère sont régulées entre autre par Rab7-GTPase (Seaman et al., 2009) et d'autre part par le dimère Rab9-TIP47 (Figure 14) (Bulankina et al., 2009) ; (Johannes et Popoff, 2008).

➤ **De l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique**

Certains facteurs du trafic sont retournés dans le RE suivant un mécanisme dépendant du COPI et conservé chez *T. gondii* (Hoppe et Joiner, 2000) ; (Dodonova et al., 2015). Chez les organismes eucaryotes y compris les *Apicomplexa*, COPI est caractérisée par la protéine ARF et 7 sous unités protéiques qui interagissent entre elles (Figure 12) (Dodonova et al., 2015) ; (Kibria et al., 2019). Ces différentes sous unités qui entrent dans la composition de COPI, en s'associant semblent jouer les rôles des AP1 et de AP2 comme facilitateur de la sélection des vésicules (McMahon et Mills, 2004) ; (Dodonova et al., 2015). ARF qui assure la régulation de l'intégrité du Golgi chez les mammifères est associé directement à la membrane provoquant ainsi la courbure membranaire (Figure 12) suivie du drainage des protéines membranaires dans la vésicule suite à son activation (Hsu et al., 2009).

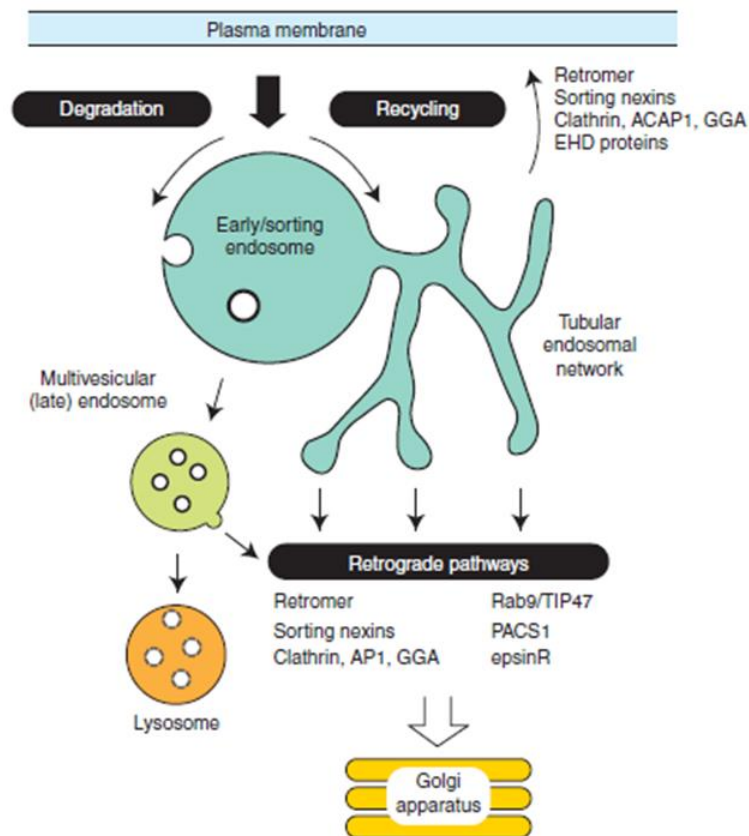


Figure 14 : Voies rétrograde et de recyclage endosomales des récepteurs chez les eucaryotes (Burd et Cullen, 2014).

VII-3 Mécanisme de sécrétion des protéines des micronèmes, des rhoptries et de granules denses et leurs rôles chez *T. gondii*

Les organites sécrétoires spécifiques à savoir les micronèmes, les rhoptries et les granules denses, qui caractérisent les parasites *Apicomplexa*, libèrent de façon séquentielle leurs facteurs de virulence à savoir les MICs, ROPs/RONs et GRAs respectivement au cours l'infection (Carruthers et Sibley, 1997). En effet, les mécanismes moléculaires de la sécrétion des protéines sont encore très peu connus, mais plusieurs facteurs connus y sont impliqués (Sparvoli et Lebrun, 2021).

➤ Sécrétion des protéines des micronèmes

Les contenus des micronèmes sont les toutes premières sécrétées et de façon régulée suite à l'établissement du contact de la membrane plasmique du parasite avec celle de l'hôte au cours de l'invasion de la cellule hôte par *T. gondii*. Les micronèmes renferment aussi des adhésines qui interagissent avec le moteur actine-myosine du parasite en fournissant la force motrice de l'invasion (Keeley et Soldati, 2004). La sécrétion des protéines MICs se déroule à

la surface des parasites *Apicomplexa* puis précisément au pôle apical (Lebrun et al., 2005) et dépend d'un bon nombre de facteurs indispensables.

L'acide phosphorique et la phosphatidylsérine sont identifiés comme des facteurs lipidiques clés indispensables de la sécrétion des micronèmes chez les *Apicomplexa* (Bullen et al., 2016) ; (Kumar Sah et al., 2019) ; (Bisio et al., 2022). En effet, grâce à son domaine PH, la protéine *TgAPH* (*Acylated Pleckstrin Homology Domain-containing Protein*) située à la surface des micronèmes se lie à l'acide phosphatidique condensé au niveau de la membrane plasmique du parasite, provoquant ainsi la fusion membranaire à l'origine de la sécrétion des protéines des micronèmes (Darvill et al., 2018) ; (Bisio et al., 2022). L'absence de la sécrétion des protéines des micronèmes a été constaté à la suite de l'ablation du gène de *TgAPH* (Bullen et al., 2016). Par ailleurs, les protéines *DOC2-1* (*Double C2-1 Domain*) présentes chez les *Apicomplexa* dont *T. gondii* et *P. falciparum* sont connues pour assurer le recrutement des facteurs de la fusion membranaire comme le complexe SNAREs et la protéine *FER* (*Ferlin*) en occurrence *TgFER1* nécessaire pour l'excrétion des micronèmes chez *T. gondii* (Farrell et al., 2012) ; (Tagoe et al., 2020) ; (Tagoe et al., 2021). La fusion membranaire est également fort dépendante du taux élevé de Ca^{2+} intracellulaire (Kawase et al., 2007) qui initie la migration des protéines des micronèmes vers la membrane plasmique (Singh et al., 2010) (Figure 15). L'exocytose de certaines protéines MICs dépend parfois d'interaction entre les protéines. La sécrétion de la protéine *MIC2* dépendante de *M2AP* est stimulée pour le calcium intracellulaire chez *T. gondii* (Wetzel et al., 2004). Des perturbations ont été observées dans la libération du complexe *TgM2AP-TgMIC2* par les micronèmes, suite au clivage du propeptide *TgM2AP* de *T. gondii* (Harper et al., 2006). De même, l'absence de la sécrétion de *MIC2* a été observée chez les parasites Knock Out de la protéine *M2AP* (Wetzel et al., 2004) ; (Huynh et al., 2003). Chez *P. falciparum* le Ca^{2+} intracellulaire permet la translocation de la protéine transmembranaire *EBA175* (*Erythrocyte Binding Antigen*) des micronèmes vers la membrane plasmique du parasite (Singh et al., 2010).

➤ **Rôle des protéines des micronèmes**

Tout juste après leur décharge à la surface de la cellule hôte, les protéines MICs établissent immédiatement de fortes interactions spécifiques avec les récepteurs membranaires de la cellule hôte (Reiss *et al.*, 2001) ; (Huynh et Carruthers, 2006). Les complexes MIC-récepteurs sont déplacés vers l'extrémité postérieure du parasite grâce à la myosine, ce qui propulse le parasite à l'intérieur de la cellule hôte (Pino et Soldati-Favre, 2011). Les protéines des micronèmes forment divers complexes (voir Tableau I) entre elles et parfois avec les protéines *RON* des rhoptries (*Rhoptries neck proteins*). Ces divers complexes formés favorisent

l'action de chacun des composants dans la motilité, les différentes étapes de l'invasion ainsi que dans la sécrétion des rhoptries et des micronèmes (Sheiner et al., 2010).

Tableau I : Différents complexes formés entre les protéines de micronèmes et de rhoptries ainsi que leurs rôles

Complexes	Rôles
MIC1/MIC4/MIC6	-Favorise le trafic de MIC1 et MIC4 grâce au clivage de MIC6 (Azzouz <i>et al.</i> , 2013) ; (Zhang <i>et al.</i> , 2019)
MIC2/M2AP	-Constitue un complexe de virulence déterminant de l'infection de la cellule hôte (Azzouz <i>et al.</i> , 2013) ; (Zhang <i>et al.</i> , 2019) -M2AP facilite le transport de MIC2 à travers les voies de sécrétion. MIC2 se fixe à la surface de la cellule hôte pour connecter <i>T. gondii</i> et la cellule hôte (Huynh et Carruthers, 2006) ; (Rabenau <i>et al.</i> , 2001)
MIC3/MIC8	-Essentiel pour former la jonction mobile par le parasite et la sécrétion des rhoptries (Kessler <i>et al.</i> , 2008)
RON2/RON4/RON5/RON8/AMA1	-Complexe se situe uniquement au niveau de la jonction mobile et est ancré dans la membrane parasitaire grâce au <i>Apical Membrane Antigen 1</i> (AMA1) (Alexander <i>et al.</i> , 2005) ; (Sheiner <i>et al.</i> , 2010)

➤ Sécrétion des protéines des rhoptries

Tout comme celle des micronèmes, la sécrétion des rhoptries se déroule de façon régulée et à la suite de la libération des micronèmes chez les *Apicomplexa* (Carruthers et Sibley, 1997). Les protéines de rhoptries sont réparties en deux catégories : les protéines ROP (*Rhoptries bulb proteins*) qui sont localisées au niveau du bulbe postérieur des rhoptries alors que les protéines RON (*Rhoptries neck protein*) sont situées au niveau du cou des rhoptries (Bradley *et al.*, 2005) ; (Gubbels et Duraisingh, 2012).

En effet, plusieurs facteurs interviennent dans la sécrétion des protéines RONs / ROPs des rhoptries. Les protéines Nd (*Non-Discharge*) aussi importantes qu'elles soient, sont conservées chez les *Alveolata* en particulier chez les parasites *Apicomplexa* et les ciliés tout comme chez les dinoflagellés (Froissard *et al.*, 2004) ; (Aquilini *et al.*, 2021). Les protéines Nd6 et Nd9 contribuent à la formation des rosettes sous forme de petites particules intramembranaires et qui se fusionnent avec les vésicules apicales des parasites (Figure 15)

pour favoriser ainsi la libération des protéines des rhoptries au niveau apical des *Apicomplexa* (Aquilini et al., 2021). Cette sécrétion des rhoptries dans laquelle intervient des vésicules apicales, se fait par le biais de RSA (*rhoptry secretory apparatus*) situé à l'apex des parasites. En effet, le complexe RSA est identifié chez *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum* tout comme chez *Cryptosporidium parvum* comme étant à l'origine de l'ancrage des vésicules apicales au sein de la membrane des parasites (Mageswaran et al., 2021) ; (Martinez et al., 2022). A la suite de leur ancrage, les vésicules apicales amènent les protéines de rhoptries à la membrane plasmique des parasites puis précisément à l'apex pour leur excrétion dans la cellule hôte. L'absence de *TgNd6* et *TgNd9* chez *T. gondii* affecte considérablement la sécrétion des protéines des rhoptries due au non ancrage des vésicules à l'apex suite au changement de la conformation RSA (Aquilini et al., 2021) ; (Mageswaran et al., 2021).

Les phospholipides jouent un rôle important dans la sécrétion des protéines des rhoptries. Chez *T. gondii* tout comme chez son homologue *Apicomplexa P. falciparum*, la protéine RASP2 (*Rhoptry Apical Surface Proteins*) située aux extrémités des rhoptries (Figure 15), possède des domaines *Ca²⁺ dependent lipid-binding* et PH (*Pleckstrin homology domain*) à partir desquels RASP2 fixe les phospholipides membranaires (PA et de PI2P) (Suarez et al., 2019). La condensation de l'acide phosphatidique (PA) et du phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate (PI2P) constitue un facteur clé qui favorise le contact des rhoptries avec la membrane plasmique des parasites (Martin, 2015). Ce contact membranaire est à l'origine du recrutement des facteurs de fusion tels que le complexe SNARE ou encore des protéines hypothétiques induisant ainsi la fusion membranaire qui peut aussi dépendre du RSA déclenchant ainsi la sécrétion des protéines des rhoptries au sein de la cellule hôte chez les *Apicomplexa* (Suarez et al., 2019) ; (Mageswaran et al., 2021) ; (Chaabene et al., 2021). Bien qu'étant un facteur de fusion membranaire, le complexe protéique SNARE conservé aussi bien chez les mammifères que chez les *Apicomplexa*, n'est nullement impliqué dans la sécrétion des protéines des rhoptries chez les *Apicomplexa* (Ayong et al., 2007) ; (Bisio et al., 2020). Par ailleurs, la protéine *TgFER2* (*Ferlin 2*) qui interagit avec le complexe protéique *TgNd6-TgNd9* régule la sécrétion des rhoptries. En l'absence de *TgFER2*, il y a blocage non seulement la libération des RONs mais aussi la mise en place de la jonction mobile chez les tachyzoïtes de *T. gondii* (Coleman et al., 2018) ; (Aquilini et al., 2021).

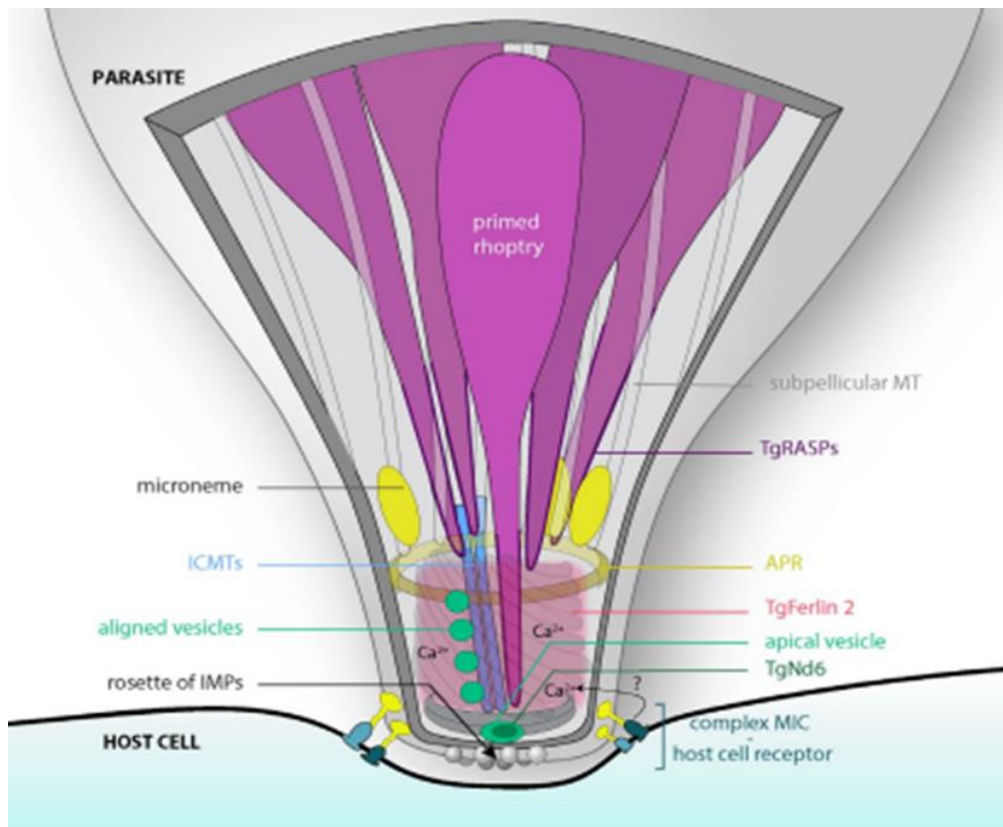


Figure 15 : Système de sécrétion des protéines des rhoptries et des micronèmes chez *T. gondii* (Chaabene et al., 2021).

ICMT : Microtubules Intra conoïdales, IMPs : Particules Intramembranaires, TgRASPs : Protéines Apicales des Rhoptries, APR : Anneau du Pôle Apical

➤ Rôle des protéines des rhoptries

Les protéines RONs sont dans un premier temps libérées pour participer à la mise en place de la jonction mobile et s'en suit la libération des ROPs dans le cytoplasme de l'hôte (Melo et al., 2011) ; (Bradley et Sibley, 2007). Le complexe protéique RON 2, 4, 5 du cou des rhoptries sécrété à la surface, est fortement impliqué dans la formation de la jonction mobile indispensable à l'invasion (Alexander et al., 2005) ; (Lebrun et al., 2005).

Certaines protéines ROP une fois injectées dans le cytoplasme de la cellule hôte, ciblent le noyau de ce dernier en perturbant l'expression des gènes de l'hôte (Gilbert et al., 2007) ; (Saeij et al. 2007). D'autres, par contre, sont sécrétées dans la vacuole parasitophore après l'invasion, c'est le cas par exemple de ROP2 et de ROP4 (Carey et al., 2004) ; (Beckers et al., 1994). Fixée ensuite à la MVP, ROP2 connecte le parasite à la mitochondrie de la cellule hôte, à partir de sa queue N-terminale (Beckers et al., 1994) ; (Nakaar et al., 2003), alors que ROP4 subit plusieurs phosphorylation à la fois par les kinase de l'hôte et du parasite (Carey et al., 2004). Les protéines les plus abondantes dans les rhoptries sont celles de la famille de ROP2 incluant ROP4, ROP5,

ROP7 et ROP18 ayant leur domaine sérine/thréonine (S/T) kinase conservé (Hanks et Hunter 1995) ; (Hajj et al., 2007). De toutes ces protéines kinases, seule ROP2 permet d'ancrer la mitochondrie de la cellule hôte à la membrane vacuolaire (Pernas et al., 2014). Quant à la protéine ROP18 aussi libérée dans la VP, celle-ci est en mesure de s'autophosphoryler et de phosphoryler aussi ROP2 (El Hajj et al., 2007). Elle est également considérée comme le facteur de virulence majeur des parasites de type I et est capable de réduire la durée du cycle de réplication du parasite dans la cellule hôte (El Hajj *et al.*, 2007). La protéine ROP18 inhibe la réponse innée de la cellule hôte. Chez l'humain, elle inhibe l'expression de l'IFN- β et bloque aussi le recrutement de l'ubiquitine, la p62 et LC3 dans la VP et phosphoryle la P62 empêchant ainsi la suppression du parasite (Chen et al., 2022).

➤ **Sécrétion des protéines des granules denses**

L'excrétion des protéines des granules denses se fait de façon constitutive et survient immédiatement après l'invasion de la cellule hôte et la mise en place de la vacuole parasitophore (Chaturvedi et al., 1999). Les protéines GRAs sont libérées précisément dans la partie luminale de la VP où elles sont plus concentrées d'ailleurs (Carruthers et Sibley, 1997) ; (Mercier et Cesbron-Delauw, 2015) et aussi dans la membrane de la vacuole parasitophore (Venugopal et al., 2020) et pourrait faire intervenir le complexe NSF/SNAP/SNARE/Rab qui coordonne avec les protéines de l'hôte infecté (Chaturvedi et al., 1999). Certains effecteurs GRAs sont libérés directement dans le cytoplasme de la cellule hôte, c'est le cas de GRA16 qui est excrétée dans le noyau de la cellule hôte durant la multiplication intracellulaire de *T. gondii* (Mercier et Cesbron-Delauw, 2015). L'entrée des protéines GRAs dans les voies de sécrétion est due à la présence du peptide signal logé du côté N-terminal des protéines (Mercier et al., 2005). Le mécanisme de sécrétion des effecteurs des granules denses est très peu élucidé par rapport à ceux des micronèmes et des rhoptries chez les parasites *Apicomplexa* (Griffith et al., 2022). La protéine *TgARF1* (*Toxoplasma gondii* ADP-Ribosylation Factor 1) située au niveau du Golgi est essentielle pour l'excrétion des protéines GRAs (Liendo et al., 2001). En effet, l'interaction entre *TgARF1* et la GTP γ S (Guanosine 5' 3-O-thiotriphosphate) augmente le niveau de cette dernière, une condition très favorable pour stimuler la sécrétion des GRAs (Chaturvedi et al., 1999) ; (Liendo et al., 2001). La petite protéine G, Rab11A-GTPase connue comme facteur de régulation de l'exocytose chez la cellule eucaryote, est identifiée au niveau du Golgi et de l'ELC et favorise la sécrétion des protéines GRAs chez *T. gondii* (Venugopal et al., 2020). Cette sécrétion est régulée négativement par le taux de Ca²⁺ cytosolique chez *T. gondii* (Katris et al., 2019). L'implication succincte de DOC2 et de *Ferlin* dans l'exocytose des granules denses

n'est pas bien élucidé comme chez les micronèmes et les rhoptries chez les *Apicomplexa* (Tagoe et al., 2020).

➤ Rôles des protéines des granules denses

Les effecteurs des granules denses modulent principalement la réponse immunitaire et le métabolisme de la cellule hôte lors de l'infection toxoplasmique (Hakimi et al., 2017). Nombreuses sont protéines GRAs qui se stabilisent après leur insertion dans la MPV (Braun et al., 2008), c'est le cas des protéines GRA3, GRA5 et P29/GRA7 qui une fois libérées lors du développement intracellulaire de *T. gondii*, se lient à l'IVN (*intravacuolar network*) tout comme à la membrane de la vacuole parasitophore (Fischer et al., 1998) ; (Cesbron-Delauw, 1994). L'effecteur GRA3 se fixe aussi à l'appareil de Golgi de la cellule hôte pour perturber le transport rétrograde de l'hôte et participe également à la séquestration et le transfert des éléments nutritifs de l'hôte au sein de la vacuole parasitophore du parasite (Deffieu et al., 2019). L'hydrophobicité de l'hélice alpha renfermée par certaines protéines GRAs favorise leur attachement à la membrane de l'IVN, c'est le cas par exemple de GRA2 et GRA9 (Mercier et al., 2005). Une fois dans le noyau de la cellule hôte, GRA16 assure l'activation du facteur de transcription NFAT4 (*Transcription Factor Nuclear factor of Activated T cells 4*) des gènes chez l'hôte dont le parasite prend le contrôle (Ma et al., 2014). GRA16 est aussi impliquée dans la modulation du niveau d'expression de la protéine p53 (suppresseur de tumeur) et des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Bougdour et al., 2013).

Les protéines GRA17 et GRA23 après leur libération, fournissent une base moléculaire pour la perméabilité de MVP et à l'accès aux nutriments de la cellule hôte (Gold *et al.*, 2015). Elles reprogramment aussi la cellule hôte en régulant l'expression des gènes ainsi que la réponse immunitaire pour la survie intracellulaire du parasite (Bougdour *et al.*, 2014) ; (Rosowski *et al.*, 2014) ; (Shastri *et al.*, 2014). Par exemple, GRA24 qui permet au parasite de modifier le transcriptome de l'hôte, traverse la VP puis s'autophosphoryle avant d'intégrer le noyau de la cellule hôte dans lequel elle relocalise la protéine p38 *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) de l'hôte dont le rôle est de réguler l'expression des cytokines (Baldassare *et al.*, 1999) ; (Braun et al. 2013). En effet, certaines protéines GRAs s'associent entre elles comme avec certaines ROPs pour assurer la maturation de la vacuole parasitophore et d'autres fonctions (Fox *et al.*, 2019). Ainsi le complexe GRA17-GRA23 situé au niveau de la MVP est impliqué dans le trafic des petites molécules entre *T. gondii* et l'hôte à travers l'IVN (Gold et al., 2015). De plus, GRA12 reconnue pour conférer une résistance du parasite à IFN- γ lors de la réponse innée de l'hôte (Fox et al., 2019), établie aussi une liaison avec ROP18 pour contribuer à la

croissance et à la virulence du parasite. L'altération simultanée des deux gènes (complexe GRA12-ROP18) a entraîné aussi bien une forte atténuation de la virulence ainsi que la croissance du parasite chez la souris (Wang et al., 2020).

VII-4 Transport des lipides chez *T. gondii*

Les lipides sont indispensables à la mise en place de la membrane plasmique chez tous les organismes eucaryotes (Shunmugam et al., 2022). Les lipides présentent une grande importance pour les *Apicomplexa*. La génération de la VP et de la MVP ainsi que leur élargissement et la multiplication intracellulaire de *T. gondii* dont dépend sa survie requièrent de la présence du cholestérol, des phospholipides, des céramides et des sphingolipides (Romano et al., 2013) ; (Nyonda et al., 2022) ; (Shunmugam et al., 2022). Une bonne partie des lipides dont dépend *T. gondii* provient de la cellule hôte infectée, mais malheureusement les voies métaboliques impliquées dans le détournement de ces lipides par le parasite sont très peu connues et restent encore à élucider (Romano et al., 2013) ; (Shunmugam et al., 2022). En plus de leurs rôles dans la régulation du trafic, les protéines GTPase-*TgRabs* sont aussi impliquées dans le détournement de certains lipides de l'hôte dont dépend le parasite. *TgRab5* a été identifiée comme une protéine qui facilite l'incorporation du cholestérol de l'hôte au sien du parasite via la voie de TGN (Robibaro et al., 2002). Grâce au trafic vésiculaire médié par les protéines *Rabs*, *T. gondii* détourne les sphingolipides de la cellule hôte. Il a été montré que les protéines GTPase-*TgRab14-30-43* se lient aux vésicules donneurs provenant du Golgi de la cellule hôte et qui renferment des sphingolipides qui sont transférés dans la VP du parasite qui est entre autre l'accepteur (Romano et al., 2013).

Le maintien de l'homéostasie lipidique est indispensable à la survie de toutes les cellules eucaryotes. Tout comme les autres *Apicomplexa*, *T. gondii* dispose d'un système qui lui permet de contrôler aussi bien le niveau des lipides détournés ou synthétisés en les distribuant dans les organites et dans la VP afin de pouvoir maintenir l'homéostasie lipidique (Ehrenman et al., 2010). Chez les mammifères comme chez les *Apicomplexa*, le trafic des lipides médié par des protéines spécialisées s'effectue suivant un mode non vésiculaire entre les différents compartiments (Das et Nozaki, 2018) ; (Lev, 2010). C'est le cas des protéines ABCG pour *ATP-Binding Cassette* de la famille des protéines G (Velamakanni et al., 2007) ; (Tarr et al. 2009) et les protéines START (*StAR-related lipid transfer*) reconnues chez les eucaryotes pour le transport et la distribution des lipides dans les divers compartiments subcellulaires (Lev, 2010) ; (Alpy et al., 2009). Grâce au système de transport non vésiculaire dépendant de l'ATP, les protéines *TgABCG77-84-89-87* s'attachent aux vésicules de la membrane plasmique et de la vacuole parasitophore dans lesquelles elles déchargent le cholestérol et des phospholipides

(Ehrenman et al., 2010). Les protéines START sont présentes chez les *Apicomplexa*, les végétaux et aussi chez les mammifères (Gardner et al., 2002) ; (Schrick et al., 2004) ; (Hill et al., 2016). Les protéines START sont caractérisées par un domaine START (*StAR-related lipid transfer*) qui est toujours localisé à l'extrémité carboxy-terminale des protéines START et constitue un assemblage d'environ 210 résidus d'acide aminé qui assurent la fonction de la fixation des lipides et du stérol (Iyer et al., 2001) ; (Soccio et Breslow, 2003).

Chez *Plasmodium falciparum*, quatre différentes protéines START ont été identifiées: PFA0210c (PF3D7_0104200), PF3D7_1463500, PF3D7_0911100 et PF3D7_1351000 (Gardner et al., 2002). Parmi celles-ci, seule PFA0210c est étudiée, elle est localisée pas seulement dans la vacuole parasitophore mais aussi dans les mérozoïtes et est plus concentrée dans les schizontes et joue ainsi un rôle crucial dans la prolifération de *P. falciparum* à l'intérieur des érythrocytes ainsi que dans la formation des membranes du parasite (Ooij et al., 2013) ; (Florens et al., 2002). La protéine *PfSTART* (PFA0210c) de *P. falciparum* est identifiée comme transporteur de plusieurs phospholipides tels que : phosphatidylcholine, phosphatidylinositol, phosphatidyléthanolamine et sphingomyéline et le domaine C-terminal (domaine START) de PFA0210c assure la régulation du transfert des lipides (Ooij et al., 2013) ; (Hill et al., 2016). Il a été montré que l'absence du domaine START de PFA0210c augmente de façon considérable le niveau des différents lipides transférés chez *P. falciparum* (Hill et al., 2016).

Chez les mammifères 15 protéines START sont connues et nommées STARD (Start Domaine) et sont identifiées comme transporteurs d'une variété de lipides dans divers compartiments (Soccio et Breslow, 2003). La nature des ligands (lipides) transportés est connue pour peu de STARD humaines (Alpy, 2005) voir tableau II dans lequel ces protéines STARD sont arrangées suivant leurs ligands et leur localisation.

Tableau II : Localisation subcellulaire et ligands des différentes protéines STARD humaines

Protéines	Localisation subcellulaire	Ligands
STARD1	- Mitochondrie - Gonades et glandes surrénales	- Transportent le cholestérol de la membrane externe mitochondriale vers le complexe P450 _{scc} au niveau de la membrane interne (Himangshu et al. 2008) ; (Alpy et al., 2001).
STARD3	- Membrane des endosomes tardifs de façon ubiquitaire	

		- STARD3 transporte aussi le cholestérol du réticulum endoplasmique vers l'endosome tardif (Wilhelm et al., 2017)
STARD4	- Réticulum endoplasmique (RE) (Rodriguez-Agudo et al., 2011)	- Transportent le cholestérol (Schrack <i>et al.</i> , 2004) ; (Alpy et al., 2009)
STARD5	-Réticulum endoplasmique, cytoplasme et appareil de golgi (Letourneau <i>et al.</i> , 2013)	
STARD6	-Cytoplasme et mitochondrie (Calderon-Dominguez et al., 2014)	
STARD2	-Cytoplasme, noyau et mitochondrie (de Brouwer et al., 2002) ; (Kang <i>et al.</i> , 2010)	-Transportent la phosphatidylcholine (Olayioye <i>et al.</i> , 2005) ; (Horibata et Sugimoto, 2010)
STARD7	- Cytoplasme et mitochondrie (Horibata et Sugimoto 2010)	- STARD10 transporte en plus la phosphatidyléthanolamine (Kang <i>et al.</i> , 2010)
STARD10	- Membrane cellulaire et cytoplasme	
STARD11	- Cytoplasme et Golgi	- Transporte la céramide du RE vers le golgi où elles sont converties en sphingolipides (Kumagai <i>et al.</i> , 2005) ; (Alpy et Tomasetto, 2014)
STARD8	- Noyau et cytoplasme (Zhang <i>et al.</i> , 2018)	- Ligands non connus (Thorsell <i>et al.</i> , 2011) ; (Alpy <i>et al.</i> , 2009)
STARD9	- Associée aux microtubules et aux centrioles (Torres <i>et al.</i> , 2011) ; Tugaeva et Sluchanko, 2019)	- Ligands non connus (Thorsell <i>et al.</i> , 2011) ; (Alpy <i>et al.</i> , 2009)
STARD12 et STARD13	-Localisation subcellulaire inconnue (Tugaeva et Sluchanko, 2019)	
STARD14	- Microsome et noyau (Alpy, 2005)	
STARD15	- Cytoplasme (Alpy, 2005)	

Les localisations précises des protéines START chez les *Apicomplexa* et en particulier chez *T. gondii* ne sont pas connues sauf le travail préliminaire sur *P. falciparum* qui identifie uniquement PFA0210c dans la VP et dans des vésicules intraparasitaires lors de la maturation

des schizontes en mérozoïtes. Comme il existe plusieurs candidats STARTs dans les génomes des *Apicomplexa*, il serait intéressant d'approfondir leurs localisations subcellulaires ainsi que leurs fonctions précises car il reste à déterminer chez les *Apicomplexa* les natures des lipides que ces START transportent et transmettent aux compartiments membranes accepteurs.

VIII Rôles des domaines Bin-Amphiphysin-RVS (BAR), Set Binding Factor (SBF2) et myotubularin-related (MTMR) lipid phosphatases des protéines chez les eucaryotes

VIII-1 Le domaine Bin-Amphiphysin-RVS (BAR) des protéines

Chez les eucaryotes, allant de la levure à l'homme, plusieurs gènes (environ 750) sont connus pour coder pour des protéines contenant le domaine BAR (F-BAR) impliqué dans la détection des courbures membranaires ainsi que la formation vésiculaire (Stanishneva-Konovalova et al., 2015) ; (Nishimura et al., 2018). Dans la structure du domaine F-BAR, il n'existe aucune poche spéciale destinée aux phosphoinositides (Nishimura et al., 2018). Mais étant en liaison avec la membrane, le domaine F-BAR des eucaryotes se lie préférentiellement à des phospholipides membranaires comme la phosphatidylsérine, phosphatidylinositol-4,5 diphosphate (PI (4,5) P2) et (PI (3,4,5) P3) grâce à l'interaction qui se crée entre les charges positives des acides aminés et celles négatives de ces lipides (Daumke et al., 2014) ; (Suetsugu et al., 2014). Chez l'homme, il existe près de 300 protéines contenant le domaine pleckstrin homology (PH) qui lie spécifiquement (PI (4,5) P2) (Lenoir et al., 2015). La présence de ce domaine PH chez certaines protéines à domaine BAR confère une forte affinité de ces protéines au phosphatidylinositol-4,5 diphosphate (PI(4,5)P2) (Sharma et Caplan, 2016).

VIII-2 Les domaines Set Binding Factor (SBF2) et MTMR des protéines

Les protéines contenant le domaine myotubularine lié (MTMR) aux phosphoinositides phosphatases et de domaine myotubularine pseudo-phosphatases dont fait partir set binding factor (SBF2) sont présentes chez les mammifères, la drosophile et les ciliés (qui sont du même règne ancestral que les *Apicomplexa*) (Kim et al., 2003) ; (Senderek et al., 2003). Ces domaines sont très conservés chez les organismes eucaryotes (Kim et al., 2003). Il existe plusieurs MTMRs aussi bien chez l'homme que chez la drosophile (Velichkova et al., 2010) ; (Manzèger et al., 2021). Grâce à son activité de facteur d'échange de guanine (GEF), SBF2 induit l'activation des petites protéines G endosomales en l'occurrence le Rab21 GTPase liée au PI(3)P avec lequel interagit MTMR chez la drosophile (Jean et al., 2012). MTMR assurent la régulation active de PI(3)P au niveau de l'endosome précoce et tardif chez l'homme (Cao et al., 2008). Il existe ainsi une coordination dans la régulation des PI (3)P et Rabs GTPase assurée

par ces deux domaines dans le trafic endosomal chez les eucaryotes (Jean et al., 2012). Les MTMRs sont aussi reconnus pour leur activité inhibitrice autophagique (Manzèger et al., 2021).

Problématique

La toxoplasmose est causée par *T. gondii*, il s'agit d'une maladie cosmopolite qui affecte aussi bien les hommes que les animaux. Tout comme les autres parasites *Apicomplexa*, *T. gondii* renferme trois organites sécrétoires spécifiques qui détiennent des facteurs de virulence qui favorisent l'infection et dont dépend la survie des parasites (Carruthers et Boothroyd, 2007) ; (Hernández-de-los-Ríos et al., 2019). La biogénèse de ces organites spécifiques à savoir les rhoptries, les granules denses et les micronèmes requiert la présence indispensable respectivement des ROP, GRA et des MIC protéines chez les *Apicomplexa*. Chez *T. gondii*, la protéine *TgSORT* est identifiée jusqu'à présent comme le seul récepteur qui assure le transport des MICs et des ROPs pour la biogénèse des organites associés (Sloves et al., 2012) et dont le recyclage est assuré par le complexe rétromère : *TgVPS35-TgVPS29-TgVPS26* lors du trafic intracellulaire (Sangaré et al., 2016). Récemment la protéine *TgREMIND* (*Toxoplasma gondii* *Regulators of Membrane Interacting Domains*) a été identifiée lors de l'immunoprécipitation de la protéine *TgVPS35* qui constitue le composant central du complexe rétromère et est nécessaire à la fois à la biogénèse des granules denses, des rhoptries et des micronèmes chez *T. gondii* (Sangaré et al., 2016). Les protéines partenaires *TgSORT* et *TgVPS35* apparaissent ainsi chez *T. gondii* comme deux facteurs indispensables de la biogénèse à ces organites sécrétoires spécifiques. La protéine *TgREMIND* de *T. gondii* dont l'identité est TGGT1_259720 (Toxodb) n'a fait auparavant l'objet d'aucune étude, mais est prédite pour sa liaison avec les lipides principalement les PIP2. Etant un partenaire de la protéine *TgVPS35*, la protéine *TgREMIND* pourrait être aussi impliquée dans la biogénèse des organites chez le parasite *T. gondii*. Ainsi, l'étude de la protéine *TgREMIND* a fait l'objet de ma thèse de doctorat dont l'objectif général d'explorer les fonctions biologiques de la protéine *TgREMIND* dans le trafic intracellulaire et la biogénèse des organites sécrétoires spécifiques chez *T. gondii*. Ainsi de façon spécifique, (i) nous avons identifié les partenaires de la protéine *TgREMIND* grâce à la GST pull-down et la spectrométrie de masse à partir de l'extrait protéique total de *T. gondii*. Par la suite, (ii) nous avons construit le mutant iKO-*TgREMID* grâce à la technique de Knock-Out inductible et enfin (iii) nous avons étudié les conséquences de l'absence de la protéine *TgREMIND* dans le mutant chez *T. gondii*, grâce aux microscopies confocale et électronique.

Dans un second temps, nous avons aussi porté un intérêt à la protéine *TgSTART* (START domain containing protein in *T. gondii*) car cette dernière protéine a été identifiée

parmi les partenaires de *TgREMIND* obtenus par GST-pull down suivi de spectrométrie de masse. La protéine *TgSTART* pourrait transporter et échanger le cholestérol qui est un lipide important pour les compartiments membranaires et des organites chez *T. gondii*. Etant donné que peu de choses sont connus sur l'implication réelle des lipides dans la biogenèse des organites sécrétoires de *T. gondii*, nous nous sommes intéressé aux conséquences de l'absence de la protéine *TgSTART* chez le parasite *T. gondii*. Pour ce fait, nous avons dans un premier temps construit les parasites transgéniques de *TgSTART* par la technique de Knock-in. Dans un second temps nous avons construit le mutant de *TgSTART* en utilisant la technique de l'auxine dégron inductible chez *T. gondii*.

PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES

Partie 2 : Matériels et méthodes

I-Culture cellulaire

I-1 Culture des fibroblastes humains et entretien de *T. gondii*

Les cellules HFF (*Human Foreskin Fibroblast*) sont cultivées dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) complété avec 2 mM de L-glutamine, 50 µg/mg de Penicilline/Streptomycine et (10%) de sérum de veau fœtal (PAN Biotech, Dutscher, France) dans une atmosphère humide sous 5% de CO₂ à 37°C.

Les expériences sont portées sur les tachyzoïtes des souches RHΔku80TaTi, RHΔku80, RHΔku80-TIR-3Flag et RH sauvage de *T. gondii* de type I. Ces parasites sont entretenus dans les cellules HFF confluentes par des passages successifs à chaque fois que ces tachyzoïtes lysent les HFF. Les souches RHΔku80TaTi et RHΔku80 ont subi des modifications génétiques, pouvant favoriser les expériences *in vitro*. En plus de la probabilité de recombinaison homologue élevée que possèdent ces deux souches (Huynh et Carruthers, 2009), la souche RHΔku80TaTi est sensible à l'induction à l'anhydrotétracycline (ATc) (Sheiner et al., 2011). S'agissant de la souche parasitaire RHΔku80-TIR-3Flag taguée avec l'épitope 3Flag, il contient le récepteur TIR de l'auxine qui est une hormone d'origine végétale ce qui va permettre l'inductibilité des parasites à l'acide 3-indoléacétique (IAA) pour la dégradation de la protéine d'intérêt (Brown et al., 2018).

I-2 Purification parasitaire

Pour la production des parasites aussi bien pour le western blot que pour l'immunoprécipitation, après la lyse des HFF, le tapis cellulaire est scrapé. Les parasites sont filtrés grâce aux filtres portant de membranes millipore 3µm (polycarbonate de porosité 3µm, Whatman) puis centrifugés à 2200 g pendant 12 minutes (min) à 4°C. Les culots parasitaires obtenus sont rincés une fois dans du PBS 1x dans la même condition avant d'être congelés à -20°C en attendant de les utiliser ultérieurement.

II-Biologie moléculaire

II-1 Extraction de l'ADN génomique des tachyzoïtes de *T. gondii*

L'extraction de l'ADNg des tachyzoïtes de *T. gondii* est fait suivant le protocole du Kit commercial Invitrogen (Thermo Fisher). Les culots parasitaires sont d'abord repris avec 400 µl de PBS 1x en présence de 20 µl de protéinase K et de 20 µl de RNase A, puis mélanger avant d'être incubés à température ambiante durant 2 min. Après ajout de 400 µl de tampon de lyse (pureLink, Invitrogen), les lysats sont ensuite bien mélangés puis incubés à 55°C durant 10 min avant la précipitation de l'ADNg grâce à 400 µl de l'éthanol pure. Les lysats renfermant de

l'ADNg sont appliqués à la colonne spin (pureLink, Invitrogen) puis centrifugés à 10.000xg durant 1 min à température ambiante. Après deux lavages à raison d'une fois par chacun des tampons 1 et 2 (pureLink, Invitrogen) dans les mêmes conditions, l'ADNg est enfin élué avec du tampon d'éluion (pureLink, Invitrogen) suite à une centrifugation à 10.000xg durant 1 min à température ambiante.

II-2 Extraction de l'ARNm des tachyzoïtes de *T. gondii*

Les tachyzoïtes de *T. gondii* purifiés, sont soumis à la lyse à l'aide de l'acétate de sodium (50 mM) PH 5,2, de l'EDTA (10 mM) et SDS (1%). Pour une première extraction phénolique, une quantité de phénol (identique au volume de lysat obtenu) est ajoutée au lysat et le tout est soumis à une incubation à 65°C durant 15 min, en le mélangeant de façon fréquente par vortex. La phase supérieure obtenue à la suite d'une centrifugation à 13.000xg en 5 min, est soumise à l'extraction phénol/chloroforme. Après une précipitation des ARN totaux (contenus dans la phase supérieure) durant une nuit à -20°C grâce à l'acétate de sodium (0,3 M) à PH 5,2 et 2,5 quantités d'éthanol (100%), s'en est suivie une centrifugation à 13.000xg à 4°C durant 30 min. Les culots d'ARN totaux obtenus sont lavés deux fois (13.000xg à 4°C en 10 min) à l'aide de l'éthanol 80% et après leur séchage, ils sont resuspendus dans de l'eau pure en présence RNAsine (Promega). Pour vérifier une éventuelle contamination des ARN par l'ADNg toxoplasmique, une PCR a été effectuée sur ces ARN, afin d'amplifier une bande d'environ 700 pb du gène de SuperOxyde Dismutase (SOD). Après une dégradation des ADN par l'ajout de la DNase I (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) à 1 U/μg d'ADN, à la suite d'une incubation à 37°C pendant 30 min, il s'en est suivie une nouvelle extraction des ARN à l'aide du phénol/chloroforme, puis les ARNs sont précipités à l'éthanol comme décrit précédemment.

II-3 Obtention de l'ADNc par rétrotranscription

Dans un premier temps, les ARN totaux sont incubés à 72°C durant 2 min dans de l'eau stérile en présence d'OligodT (10 μM) (Invitrogen). Le milieu réactionnel est ensuite incubé durant 1 h à 42°C, après ajout de Reverse Transcriptase AMV (125 U), RNAsine (Promega) et dNTP (25 mM) (Biolabs) pour la rétrotranscription. Enfin, s'en est suivie l'incubation de 10 min du milieu réactionnel sur la glace, avant l'extraction au phénol/chloroforme de l'ADNc, sa précipitation et son lavage comme décrit ci-dessus. L'ADNc est resuspendu dans de l'eau stérile, la qualité de l'ADNc est vérifiée par la PCR en amplifiant une bande de 200 pb du gène SOD.

II-3 Construction du mutant iKO-*Tg*REMIND par clonage dans le plasmide pG13-D-T7S4

Pour créer le mutant *Tg*REMIND inductible à l'ATc, le plasmide pG13-D-T7S4 renfermant une séquence «TetO₇» (Sheiner et al. 2011), le promoteur *Tg*Sag4 de *T. gondii* et résistant à la pyriméthamine grâce à la cassette dihydrofolate réductase (DHFR-TS), est utilisé. La séquence répétée «TetO₇» inductible à l'ATc contrôle le promoteur *Tg*Sag4 (Sheiner et al. 2011). Les fragments 5' (2 kb) et 3' (1336pb) de *Tg*REMIND sont obtenus par PCR effectuée sur l'ADN génomique des tachyzoïtes de *T. gondii* à l'aide des amorces consignées dans le Tableau IV. Le fragment 5' est cloné dans le plasmide en amont de la cassette DHFR-TS grâce l'enzyme de restriction NdeI et son orientation a été vérifiée dans le plasmide par une double digestion avec les enzymes de restrictions StuI/EcoRV. Le fragment 3' contenant l'ATG et l'épitope HA introduit juste après l'ATG est cloné grâce aux enzymes de restriction AvrII/BglII dans le même plasmide en aval du promoteur inductible TetO₇-Sag4. Ainsi le gène *Tg*REMIND dans le plasmide pG13-D-T7S4-*Tg*REMIND est sous le contrôle du promoteur inductible TetO₇-Sag4.

II-4 Complémentation du mutant iKO-HA-*Tg*REMIND par clonage dans le vecteur pUPRT

Le vecteur pUPRT renfermant les fragments 5' (1 kb) et 3' (1 kb) du gène UPRT (Uracil PhosphoRibosyl Transferase) non essentiel au parasite (Donald et Roos, 1995) a été utilisé pour compléter les parasites iKO-HA-*Tg*REMIND. Tous les fragments clonés dans ce plasmide lors de nos expériences ont été obtenus par PCR et ont été séquencés, les amorces et enzymes de restrictions utilisées sont consignées dans le Tableau III. Le gène de *Tg*REMIND entier soit 2928pb, ses domaines N-terminal F-BAR soit 1158pb et C-terminal REMIND soit 1770pb, tous tagués avec l'épitope Flag sont obtenus par PCR sur l'ADNc précédemment obtenu. Dans un premier temps, la région promotrice de GRA1 (1508 pb) obtenu à partir de l'ADNg des tachyzoïtes de *T. gondii* a été clonée dans ce plasmide en aval du 5'UPRT grâce aux enzymes de restriction ASCI et StuI. Ensuite, *Tg*REMIND entier est cloné en aval du promoteur GRA1 grâce aux enzymes de restriction StuI et AvrII. Chacun des domaines N-terminal F-BAR et C-terminal REMIND a été cloné à l'aide des enzymes de restriction StuI et AVrII en lieu et place de *Tg*REMIND après une double digestion du plasmide contenant *Tg*REMIND avec StuI et AVrII. Enfin, 350bp de la région 3'SAG1 également obtenu à partir de l'ADNg des tachyzoïtes de *T. gondii* a été cloné en amont de la région 3'UPRT grâce aux enzymes AvrII et PacI.

II-5 Obtention des parasites transgéniques par la technique de Knock-In

Le fragment d'ADN génomique 3,27 kb de *TgSTART* est amplifié par PCR, à partir de l'ADNg des tachyzoïtes en utilisant les amorces consignées dans le Tableau IV. Ce fragment contient un site de restriction unique mais absent dans le plasmide de clonage de ligation indépendant (pLIC) (Huynh et Carruthers, 2009), (Figure 16). Le plasmide pLIC-3HA-DHFR linéarisé par PacI puis purifié et le fragment *TgSTART* sont traités au T4 DNA polymérase. Le traitement de 0,2 pmol de *TgSTART* purifié est réalisé avec l'ajout de 4 mM de dCTP, 5 mM de DTT, 1 x de tampon T4 DNA polymérase et 1 Unité de T4 DNA polymérase (20 µl de volume final). Quant au pLIC purifié (2 µg), le milieu réactionnel (30 µl final) est le même que celui de l'insert et 4 mM de dGTP est utilisé à la place de dCTP (Stols et al., 2002). Le milieu réactionnel est incubé à 12°C pendant 15 min puis la réaction est arrêtée à 75°C pendant 20 min en présence de 10 mM de l'EDTA (Biolabs). Après purification, 3 µl de l'insert (*TgSTART*) sont incubés avec 1,5 µl pLIC-3HA-DHFR pour une ligation à température ambiante durant 15 min puis 1 µl de l'EDTA (25 mM) est ajouté suivi d'une incubation à température ambiante de 5 min. Les cellules compétentes sont transformées avec 1 µl du produit de ligation.

II-6 Obtention du mutant *TgSTART* par la technique d'Auxine dégron inductible

La technique de CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) est utilisée pour obtenir le mutant *TgSTART* (KD-*TgSTART*) selon deux étapes : dans un premier temps, obtention de l'ARN guide (gARN) CRISPR de *TgSTART* et dans un second temps, étiqueté le gène *TgSTART* avec l'épitope HA contenu préalablement dans le plasmide pLinker-AID-3xHA-DHFR-loxP (addgene, référence 86669).

➤ Obtention de gARN de *TgSTART*

Pour obtenir l'ARN guide de *TgSTART*, une séquence génomique de *TgSTART* est obtenue en amont et en aval à 500pb du codon stop dans toxoDB et est placée sur le site web EuPaGDT (<http://grna.ctegd.uga.edu/>) (Peng et Tarleton, 2015). Une séquence de protospacer (20 nucléotides) possédant la séquence NGG à la fin du codon stop et ayant le meilleur score et unique de la séquence du gène d'intérêt de *TgSTART* a été choisie. A partir de cette séquence, l'ARN guide de *TgSTART* est obtenu par mutagénèse dirigée avec le Kit Q5 (Biolabs) contre l'ARN guide de UPRT qui est situé dans le plasmide pSAG1::CAS9-U6::sgUPRT (Addgene, Cat : 54467) à l'aide des amorces consignées dans le Tableau III. Ainsi le gARN de *TgSTART* se trouve maintenant dans le même plasmide (pSAG1::CAS9-U6::sg*TgSTART*) que l'endonucléase CAS9 (Figure 16). En effet, la taille de la bande amplifiée est de 9,68 Kb (Brown, Long, et Sibley 2018) et 1 µl a été soumis à une réaction de Digestion-Kinase-Ligation (KLD) grâce à l'enzyme KLD (Biolabs), dans un milieu réactionnel (10 µl) composé de 1 µl du produit

de la PCR, 3 μ l d'eau stérile, 5 μ l du tampon KLD 2x pour 1x final et 1 μ l de l'enzyme KLD. Après une incubation à température ambiante de 5 min, 5 μ l a été utilisé pour transformer les bactéries, puis après le criblage des colonies et séquençage des clones grâce à l'amorce reverse M13 (voir Tableau III) pour confirmer la présence du gARN de *TgSTART*.

➤ **Obtention des cassettes d'homologie de *TgSTART* étiquetées avec 3xHA**

Les séquences des flancs d'homologie 5' et 3' de 30pb de *TgSTART* sont obtenues respectivement en amont du codon stop de *TgSTART* et en aval de la séquence du protospacer de *TgSTART*. Par la suite, deux séquences (voir tableau III) du plasmide pLinker-AID-3xHA-DHFR-loxP ont été chacune ajoutée à la fin du flanc 5' (en rouge sur Figure 16) et à la fin de la séquence inverse du flanc 3' (en violet sur Figure 17) de *TgSTART*. Cela a permis d'obtenir respectivement les amorces forward et reverse (voir tableau III). Les deux amorces sont utilisées pour amplifier par PCR une bande de 3,4 Kb à partir du plasmide pLinker-AID-3xHA-DHFR-loxP à l'aide du Kit Q5 (Biolabs) permettant ainsi d'étiqueter le gène *TgSTART* (Brown et al., 2018), (Figure 17). Le produit de la PCR est purifié à l'aide du Kit gel and PCR clean-up Nucleospin (Macherey-Nagel) avant la transfection des parasites.

II-7 Transfection des parasites

➤ **Transfection des parasites RH Δ ku80TaTi**

Le plasmide pG13-D-T7S4-HA-*TgREMIND* linéarisé par l'enzyme de restriction (Tableau IV), est extrait au phénol-chloroforme (2 phénol vol/vol, 1 chloroforme vol/vol). Le plasmide est ensuite précipité sur la nuit à -20°C en présence de l'éthanol (100%) et NaCl (0,3 M), avant d'être deux fois lavé à l'aide de l'éthanol (80%) à 4°C durant 10 min à 13000xg. Les tachyzoïtes de *T. gondii* fraîchement purifiés, sont récupérés dans du tampon cytomix à pH 7,6 contenant du KCl (120 mM), CaCl₂ (0,15 mM), K₂HPO₄/KH₂PO₄ (10 mM), Hepes (25 mM), EGTA (2 mM) et MgCl₂ (5mM) supplémenté avec 0,2 mM d'ATP (Sigma) et 5 mM du GSH (Sigma). Ensuite, 10⁷ parasites de la souche RH Δ ku80TaTi sont transfectés avec 50 μ g de pG13-D-T7S4-HA-*TgREMIND* et par électroporation, suivant le programme : T= 1,5 KV, C= 24 μ F, R= 24 Ω . Après 4 h post-infection, les milieux de culture sont changés et la sélection commencée 24 h post infection avec 2 μ M de pyriméthamine (Sigma) avec 3 passages sur de nouvelles cellules HFF, donc la sélection a duré approximativement 9 jours avant de l'émergence d'une population résistante à la pyriméthamine. La population résistante est clonée dans les plaques de 96 puits et les clones sont criblés par de l'immunofluorescence indirecte (IFA) afin d'identifier les clones positifs de l'iKO-HA-*TgREMIND* inductible à l'ATc.

Pour compléter les parasites iKO-HA-*TgREMIND*, 5.10⁶ parasites mutants sont dans un premier temps transfectés de façon transitoire avec 25 μ g des plasmides : pUPRT-

*Tg*REMIND-Flag, pUPRT-F-BAR-Flag et pUPRT-REMIND-Flag. Après 24h post-transfection les parasites sont fixés à l'aide de PAF (4%) et soumis à l'IFA à l'aide de l'anticorps anti Flag (Tableau V). Dans un second temps, 100 µg de chacun de ces trois plasmides sont linéarisés avec EcoRV, puis extraits au phénol-chloroforme et lavés à l'éthanol comme décrit ci-dessus puis 50 µg de chaque plasmide et 10 µg de gARN de UPRT contenu dans le plasmide pSAG1::CAS9-U6::sgUPRT sont utilisés pour transfecter 10^7 de parasites iKO-HA-*Tg*REMIND afin d'obtenir des parasites stables. La sélection est faite avec 5 µM de 5-fluoro-2'-deoxyuridine (5'FU DR) (Sigma) après 2-3 passages sur de nouvelles cellules HFF et la durée totale est de 6 à 8 jours. Le clonage par dilution limite des différentes populations résistantes ont permis d'obtenir les clones stables.

Par ailleurs, les parasites iKO-HA-*Tg*REMIND (5.10^6 tachyzoïtes) sont aussi transfectés de façon transitoire avec 25 µg de différents plasmides contenant certains marqueurs (Rab5-HA, Rab7-HA, HDEL-GFP, ERD-GFP, GalNacT-GFP et DrpB-YFP) de différents compartiments intracellulaires connus de *T. gondii*. Après 24 h post-transfection, les parasites sont fixés avec PAF (4%) suivi de l'IFA.

➤ **Transfection des parasites RHΔku80 avec pLIC-3HA-DHFR-*Tg*START**

Après la linéarisation du plasmide pLIC-3HA-DHFR-*Tg*START (Figure 16) par l'enzyme de restriction (Tableau IV), le plasmide est ensuite extrait au phénol-chloroforme et précipité comme décrit ci-haut. 10^7 tachyzoïtes de RHΔku80 fraîchement purifiés et repris dans du tampon cytomix en présence de 5 mM du GSH (Sigma) et 0,2 mM d'ATP (Sigma), sont transfectés avec 50 µg de pLIC-3HA-DHFR-*Tg*START par électroporation. Le milieu de culture a été changé après 4 h post-infection, le reste du fragment *Tg*START situé du côté 3' du plasmide se recombine avec son homologue dans le génome du parasite (Figure 16). Après 9 jours de passage et sélection avec 2 µM de pyriméthamine (Sigma), la population résistante est clonée par dilution limite dans les plaques de 96 puits et les clones sont criblés par de l'IFA pour identifier les clones positifs de KI-*Tg*START.

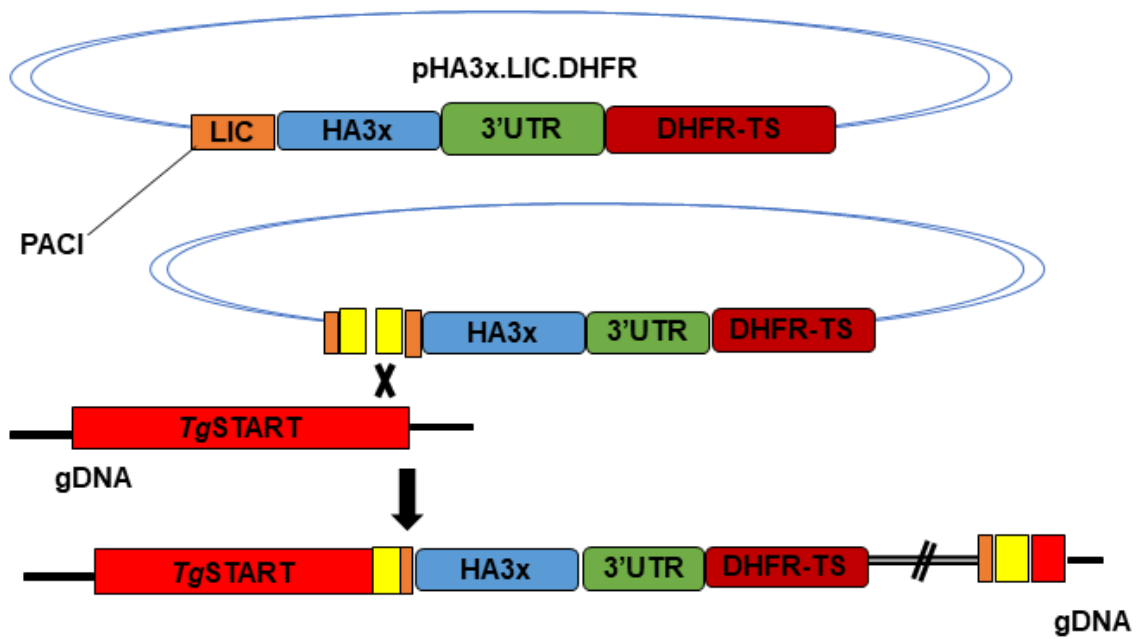


Figure 16: Stratégie d'obtention des parasites transgéniques de *TgSTART*

➤ **Transfection des parasites RH Δ ku80-TIR1-3FLAG**

10^7 tachyzoïtes de RH Δ ku80-TIR1-3FLAG fraîchement purifiés ont été récupérés dans du tampon cytomix supplémenté avec 0,2 mM d'ATP (Sigma) et 5 mM du GSH (Sigma), avant d'être co-transfectés avec 10 μ g du plasmide pSAG1::CAS9-U6::sg*TgSTART* (gARN de *TgSTART*) et 22 μ g du plasmide pLinker-AID-3xHA-DHFR-loxP contenant les deux flancs d'homologie 5' et 3' de *TgSTART*. Après transfection, l'endonucléase CAS9 sous l'action du gARN de *TgSTART* a coupé la portion double brin ciblée du gène *TgSTART* et lors de la réparation de cette cassure, les deux flancs d'homologie 5' et 3' de *TgSTART* vont s'apparier avec leurs homologues dans le génome ce qui conduit à la double recombinaison homologue (Figure 17). La sélection avec la pyriméthamine qui a commencé 24 h post-infection durant 10 jours a permis après clonage (par dilution limite) d'obtenir des clones stables exprimant la protéine *TgSTART*-3HA-AID inductibles à l'auxine. Pour vérifier l'intégration de pLinker-AID-3xHA-DHFR-loxP dans le locus des parasites, deux différentes PCR1 et 2 (Figure 17) ont été effectuées grâce aux amorces consignées dans le Tableau III. Le forward des deux PCR est situé à plus de 350bp du flanc 5' et l'amorce reverse de la PCR1 est désignée à 500bp du codon top et du côté 3' UTR du gène *TgSTART*. L'amorce reverse de la PCR2 est choisie dans la séquence du plasmide pLinker-AID-3xHA-DHFR-loxP à 50bp du gène d'AID (Brown et al.,

2018).

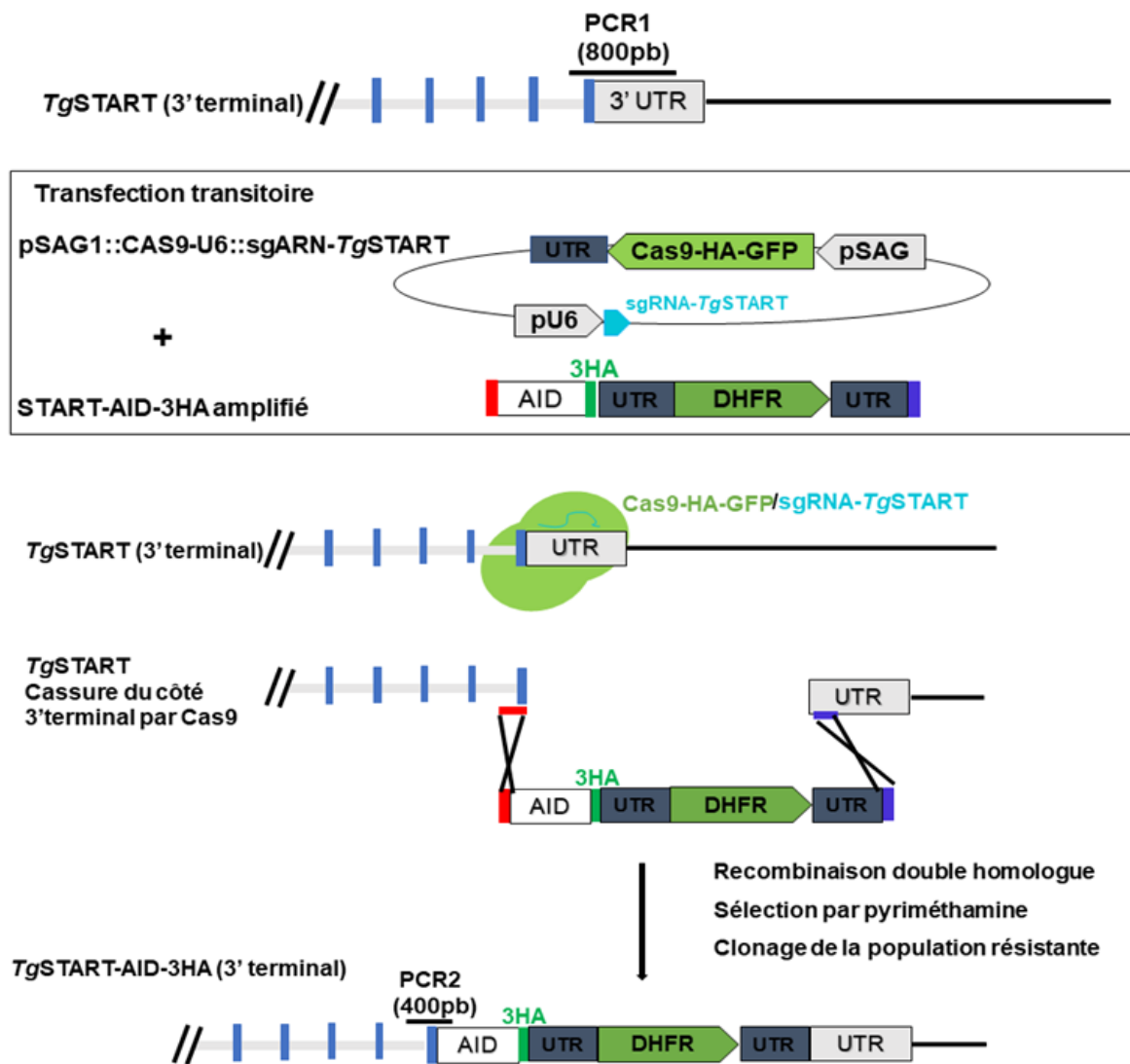


Figure 17 : Génération du mutant knockdown *TgSTART-AID-3HA*

III-Biologie cellulaire

III-1 Test d'invasion

Pour mesurer la capacité des parasites (iKO-*TgREMIND*, Comp-*TgREMIND* et Comp-*TgSFBF2*) à entrer dans les HFF, 25.10^4 parasites précédemment traités avec de l'anhydrotétracycline (ATc) à $1,5 \mu\text{g/ml}$ et sans ATc (comme contrôle) pendant 2 à 3 jours sont utilisés pour infecter les lamelles comportant des HFF confluentes pendant 3 heures puis lavés avec du milieu complet 2 fois avant de remettre du milieu complet pendant 24h. Après 24 h post infection, les parasites sont fixés avec du PAF (4%). L'immunofluorescence indirecte (IFA) est réalisée sur les parasites intracellulaires en utilisant l'anticorps dirigé contre SAG1 du parasite au $200^{\text{ème}}$, les noyaux des cellules HFF et ceux des parasites sont marqués avec du 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) au $1000^{\text{ème}}$. Les expériences ont été réalisées en triplicata et

trois fois de façon indépendante, les photos sont prises au microscope Zeiss. Les parasites intracellulaires et cellules 400 à 500 au total sont comptés et le ratio parasite-cellule est calculé pour la construction de l'histogramme.

III-2 Mesure de la motilité parasitaire

Pour évaluer la capacité du mutant *iKO-TgREMIND* à mouvoir, ce mutant est traité avec ou sans l'ATc (1,5 µg/ml) pendant 48 h. Le tapis cellulaire contenant les parasites est scrappé, passé aux seringues pour libérer les parasites contenus dans les cellules et le milieu parasitaire est filtré comme précédemment décrit. Ce milieu est centrifugé à 1000 RPM pendant 10 min à température ambiante. Les culots sont repris avec de milieu DMEM incomplet avec 10 mM de HEPES et 1 mM de l'EGTA. $5 \cdot 10^6$ tachyzoïtes ont été déposés sur des lamelles de verre qui ont été préalablement pré-incubées avec 50% de sérum de veau fetal (FBS) dans du PBS 1x incubées sur une nuit à 37°C sous 5% de CO₂, la veille de l'expérience afin de permettre l'adhésion des parasites. Ensuite, l'incubation a lieu à 37°C sous 5% de CO₂ durant 20 min, avant d'être fixés avec du PAF (4%). Des traces linéaires et circulaires observés au microscope Zeiss traduisent la motilité des parasites (Fauquenoy et al., 2008).

III-3 Test de plage de lyse

Pour mesurer la capacité d'invasion successive et la lyse des HFF par les parasites, $2 \cdot 10^2$ parasites : *iKO-TgREMIND*, les parasites complétés (*Comp-iKOTgREMIND* et *Comp-REMIND*) et de RHTaTi (comme contrôle) tous purifiés sont utilisés pour infecter les lamelles de verres contenant des HFF confluentes. En présence ou non de l'ATc (1,5 µg/ml), ces lamelles sont incubées sous 5% de CO₂ à 37°C sous une atmosphère humide pendant 7 jours sans aucun mouvement et observation des lamelles.

Après fixation au méthanol froid (-20°C) pendant 10 min des différents tapis cellulaires, les lamelles contenant les HFF infectées sont ensuite colorées durant 10 min à température ambiante avec du 0,1% de Crystal Violet (Sigma) préparé dans de l'éthanol 95% et 1% d'Oxalate d'ammonium monohydrate (Sigma). Les tapis cellulaires sont enfin rincés une fois au PBS 1x et une fois par l'eau pure. Les différentes plages de lyse observées indiquent la réplication et le développement endocellulaires de ces parasites.

III-4 Immunofluorescence indirecte

Les parasites ($2.5 \cdot 10^5$ tachyzoïtes) sont utilisés pour infecter des lamelles de verre contenant des HFF confluentes pendant 24-32h. Ensuite, le tapis cellulaire est rincé trois fois rapidement au PBS 1x puis les tachyzoïtes intracellulaires sont fixés avec 4% de PAF préparé dans du PBS 1x à température ambiante durant 30 min. Après deux rinçages rapides, les cellules

infectées sont perméabilisées avec du Triton X100 (0,2%) préparé dans du PBS 1x pendant 30 min puis après un blocage avec de FBS (10%) dans du Triton X100 (0,1 %) préparé dans du PBS 1x. Tout le reste de l'expérience est poursuivi en tampon PBS/0,1% TX-100/10% FBS (PTF) sauf les lavages qui sont avec le tampon PBS/0,1% TX-100.

Les lamelles sont ensuite incubées durant 1 h à 37°C avec l'anticorps primaire préparé dans ce tampon indiqué ci-dessus. Les différents anticorps primaires utilisés ainsi que leurs concentrations sont indiqués dans le Tableau V. Le tapis cellulaire est lavé trois fois pendant 5 min avec du Triton X100 (0,1 %) préparé dans du PBS 1x. Les lamelles sont ensuite incubées durant 30 min à 37°C avec l'anticorps secondaire Alexa fluo dilué au 1000^{ème} dans le même tampon PTF contenant en plus du bleu Evans au 1000^{ème} et du DAPI au 1000^{ème}. Les anticorps secondaires qui portent des marqueurs fluorescents Alexa utilisés lors des expériences sont à 488 nm, 568 nm, 594 nm, tous du Rat, de Lapin ou de Souris. Le tapis cellulaire est lavé trois fois à l'intervalle de 5 min du Triton X100 (0,1 %) préparé dans du PBS 1x. Les lamelles sont enfin montées avec du Mowiol puis incubées à 37°C pour séchage avant d'être observées au microscope confocal inversé SP8-X Leica (Leica DMI 6000) avec l'objectif 63x. L'acquisition des images est faite suivant les paramètres : Pixel size (12 bites), speed (400), pinhole (1 AU) et format (1024 x 1024) pour Zoom factor (4) ou format (512 x 512) pour *Zoom factor* (6) et le traitement des images est fait avec ImageJ.

III-5. Microscopie électronique

Les parasites mutants iKO-*Tg*REMIND et Comp-iKO-*Tg*REMIND intracellulaires traités avec ATc (1,5 µg/ml) et sans ATc sont fixés à l'aide du glutaraldehyde (2,5%) préparé dans du PBS à température ambiante pendant 1 h ou à 4°C sur la nuit. Après 5 séries de lavage de 5 min avec du tampon cacodylate (0,1 M), les parasites intracellulaires fixés, sont traités pendant 1 h à température ambiante avec de l'osmium (1%) et du ferrocyanure de potassium (1,5%) préparés dans de l'eau en présence de cacodylate (0,2 M). Les parasites sont ensuite soumis à une série de 3 bains d'eau de 5 min avant de subir 5 séries de déshydratation de 10 min chacune à l'aide de l'éthanol pur de concentrations variables : 50%, 70%, 90%, 100% et encore 100%. Les parasites sont enfin inclus dans la résine Epon "Agar low viscosity premix kit medium" (réf. R1165), fournisseur Agar Scientific (Oxford Instruments) puis polymérisés sur la nuit à 60°C avant d'être découpés pour des observations ultrastructurales en microscopie électronique (JEOL1400 opéré à 80 kV) (plateforme Imagerie-Gif, Institut de Biologie Intégrative de la cellule (I2BC)).

IV-Biochimie

IV-1 Production et purification des protéines recombinantes

La séquence entière du gène de *TgREMIND* et ses domaines N-terminal F-BAR et C-terminal REMIND sont synthétisés et clonés dans le plasmide pGEX-GST par GenScript grâce aux enzymes de restriction BamHI et NCOI. Les plasmides pGEX-*TgREMIND*, pGEX-F-BAR et pGEX-REMIND sont utilisés pour transformer *E. coli* 5-alpha (Biolabs), les colonies choisies ont permis de faire des mini-préparations des différents plasmides qui sont analysés par digestion avec des enzymes (Tableau V). Les ADN sont par la suite utilisés pour transformer les bactéries BL21 DE3 (Biolabs) puis des précultures de 10 ml ont été effectuées en présence de l'ampicilline (100 µg/ml) à 37°C sur la nuit. A partir de 1 à 1,5 ml de ces précultures, des cultures d'un litre sont lancées en présence de l'ampicilline pour une DO₆₀₀ initiale de 0.02. Après une incubation à 37°C pendant environ 4 à 5 h de temps pour obtenir une DO₆₀₀ égale à 0,6, l'induction de la synthèse des différentes protéines recombinantes est alors effectuée avec 0,2 mM d'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) à 20°C sur la nuit. Afin de vérifier l'efficacité des inductions protéiques, des fractions de culture non induite et induite sont migrées dans du gel de polyacrylamide 10 à 12% puis colorées au bleu de Coomassie. Après centrifugation des cultures à 6000xg à 4°C pendant 15 min, les culots obtenus sont congelés à -80°C pendant 2 h. Les culots sont lysés dans le tampon contenant 50 mM Tris-HCl pH 8 ; 250 mM NaCl ; 5% Glycérol et 0,1% Triton X-100 supplémenté avec le cocktail d'inhibiteur de protéase (1X final), 1 mg/ml lysozyme, 5 mM DTT et 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride). Après une incubation sur la glace pendant 30 min, les bactéries sont ensuite cassées par 6 cycles de sonication (30 s de pulse à 90% et 20 s de pause) et incubées à 4°C en présence de 10 mM MgCl₂ pendant 1h. Après centrifugation à 4°C durant 30 min à 2000 RPM, le lysat est incubé sur la colonne GST (Glutathion-S-transferase) à 4°C sur la nuit, en présence de 5 mM d'ATP et 1 mM PMSF. La colonne a été lavée plusieurs fois avec deux différents tampons de lavage : L1 composé de 50 mM Tris-HCl pH 7,5 et 1 M NaCl et L2 composé de 50 mM Tris-HCl pH 7,5 et 150 mM NaCl en présence de 5 mM DTT. Enfin l'élution des protéines est faite à 2500 RPM à 4°C durant 10 min, grâce au tampon d'élution composé de : 50 mM Tris-HCl pH 8 ; 150 mM NaCl et de 10 mM GSH (glutathion) supplémenté avec 5 mM DTT et 0,5 mM PMSF.

IV-2 Electrophorèse en gel d'acrylamide

Les concentrations des gels de séparation (ou inférieur) utilisés, étaient compris entre 10%-12% d'acrylamide (acrylamide/bisacrylamide, 29/1). Le gel de séparation est constitué

de : 375 mM Tris-HCl pH 8,8 ; 0,01% SDS ; 0,5% Persulfate d'Ammonium (APS) et 0,05% TEMED. Pour le gel supérieur (ou de concentration) il est constitué dans tous les cas de 5% d'acrylamide ; 125 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 0,01% SDS ; 0,75% APS et 0,075% TEMED. Coulés entre une plaque de verre, ces deux gels sont montés sur un système Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-rad). Les protéines purifiées ou les culots parasitaires sont repris dans du tampon de reprise Laemmli de composition : 62,5 mM de Tris-HCl pH 6,8 ; 2% (p/v) de SDS ; 10% (p/v) de saccharose et 0,2% (p/v) de bleu de bromophenol contenant 0,1 M final de DTT (DiThioThréitol). Les échantillons sont ensuite chauffés à 100°C pendant environ 5 min puis centrifugés pendant 3 min à 12000 xg avant d'être déposés dans le gel de polyacrylamide. Enfin, les échantillons sont soumis à une migration dans un tampon composé de 25 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 0,1% SDS et 192 mM glycine sous 70 v pour leur concentration et 120 v pour leur séparation.

IV-3 Western Blot

Après la migration, les protéines séparées sont transférées du gel de séparation sur une membrane de nitrocellulose de 0,45 micron (Thermo Fischer). Le transfert s'est déroulé dans un tampon de transfert est composé de : 25 mM Tris-HCl pH 8; 190 mM glycine et 20% de méthanol à 80 v pendant 1 h à 1 h 15 min en présence de la glace. La membrane portant les protéines et le marqueur de poids moléculaire est ensuite colorée à l'aide du rouge ponceau 0,2% préparé dans 20% d'acide acétique pendant environ 5 min, avant d'être rincée puis saturée avec du lait écrémé 5% préparé dans du TNT (15 mM Tris-HCl pH 8 ; 140 mM NaCl ; 0,05% Tween-20) à température ambiante durant 30 min. Une fois saturée, la membrane est incubée à température ambiante avec de l'anticorps primaire monoclonal ou polyclonal (Tableau VI) préparé dans le tampon de saturation à température ambiante pendant 1 h soit à 4°C sur la nuit. Après trois lavages successifs de 10 min chacun, la membrane est incubée à température ambiante durant 1 h, cette fois-ci avec de l'anticorps secondaire IgG couplé à la peroxydase (Sigma) au 10000^{ème} pour anti lapin et 2000^{ème} pour l'anti rat, soit avec l'Alexa fluo 488 nm or 594 nm (Invitrogen) dans le cas d'une fluorescence et préparé dans le tampon de saturation. Enfin, après trois séries de lavages successives, la membrane est incubée pendant 5-10 min avec de l'ECL (Enhanced ChemiLuminescence Plus Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences) puis révélée, sauf dans le cas de la fluorescence où la membrane est directement révélée sans l'ECL.

IV-4 GST-pull down *Tg*REMIND

Dans l'optique d'identifier les partenaires de la protéine *Tg*REMIND, 4.10^9 tachyzoïtes de *T. gondii* (RH TaTi) sont lysés par du tampon composé de : 10 mM Tris-HCl ; 150 mM NaCl ; 1 mM MnCl₂ ; 1 mM CaCl₂ ; 1% Triton x-100 en présence d'inhibiteur de protéase à 4°C pendant 1h sous agitation rotative. Après centrifugation à 4°C à 10000 RPM pendant 30 min, le surnageant est incubé avec 100 µg de chaque protéine recombinante *Tg*REMIND, F-BAR et REMIND couplée à la GST ou avec de la GST toute seule à 4°C pendant une nuit. Enfin, après 5 lavages avec le tampon de lyse et sans inhibiteurs de protéases et élution, les éluats sont séparés par SDS-PAGE et les bandes sont découpées pour être analysées à l'aide de la spectrométrie de masse, grâce à la collaboration avec les Docteurs Elie Tchilabalo Ayili et Yetrib Hatrout aux Etats Unis.

IV-5 Fractionnement cellulaire

Les culots de tachyzoïtes (10^8) de *T. gondii* purifiés, ont été lysés par sonication après plusieurs séries de congélation et décongélation en présence de 300 µl de chacun des quatre différents tapons de lyse à savoir : PBS 1x, 2% Triton X-100 dans du PBS 1x, 1 M NaCl dans du PBS 1x et 0,1 M Na₂CO₃ pH 11,5. Les différents lysats obtenus ont été ultracentrifugés à 100.000 xg à 4°C pendant 2h pour leur séparation en de différentes fractions tels que solubles et insolubles. Un équivalent de 10^7 tachyzoïtes contenus dans les culots et les surnageants a été analysé par Western blot en utilisant l'anticorps anti *Tg*REMIND (Breinich et al., 2009).

V-Analyses statistiques

Les différentes données issues des expériences ont été analysées grâce au logiciel GraphPad9 et le test d'ANOVA one way ou two-way suivi du test de comparaison multiple de *Tukey* a été utilisé pour des études statistiques des données.

Tableau III : Oligonucléotides et enzymes de restrictions utilisées pour les clonages

Noms	5' Séquences 3'	Site de Restriction	Utilisation
iKO_TgREMIND_5'_F	CCGGCATATGACAGCTATTCCGGGCTGAGGTGAGCTCA	NdeI	iKO-TgREMIND
iKO_TgREMIND_5'_R	CCGGCATATGTCGTGAGAACGGCTTCAGCACGGAGTTCTT	NdeI	iKO-TgREMIND
iKO_TgREMIND_3'_F	CCGGAGATCTATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGAAGCG GAGGCCACCTG	BglII	iKO-TgREMIND
iKO_TgREMIND_3'_R	CCGGCCTAGGAGCGTTGACGGCAGACATGAC	AvrII	iKO-TgREMIND
Locus_TgREMIND_F	ACACGCGTGTTTGACAGTCTCACAC	Non	Intégration de pDTS4-TgREMIND
DHFR_Int_R	GGCGTTGAATCTCTTGCCGACTGATGGAGAGGGAAGTCC	Non	Intégration de pDTS4-TgREMIND
Compl_FLTgREMIND_F	TATTAGGCCTATGGAAGCGGAGGCCACCTGGGGGGTGGCGGGGTC C	StuI	Complémentation
Compl_FLTgREMIND_R	CCCTTAATTAACCCCTAGGTTATCACTTATCGTCATCGTCTTTGTAA TCAAAGAGCC	AvrII	Complémentation
Compl_F-BAR_R	GCATCCTAGGTCACCTTATCGTCATCGTCTTTGTAATCTGGCGTCGA CCCCGGCGC	AvrII	Complémentation
Compl_REMIND_F	GCATAGGCCTGCCCACGGCTCTTCGGGGTC	StuI	Complémentation
Compl_TgGRA1prom_F	CATTGGCGCGCCCTCACCTTTGGCTCAATCCTA	ASCI	Complémentation
Compl_TgGRA1prom_R	CGACAGGCCTCTTGCTTGATTTCTTCAAAGAACAA	StuI	Complémentation
Compl_TgSAG1_3'_F	TATTCCTAGGTCACCGTTGTGCTCACTTCTCAAATC	AvrII	Complémentation
Compl_TgSAG1_3'_R	CCCTTAATTAACCCGACGATCGCCATCGGGGTCGTGA	PacI	Complémentation

KI- <i>Tg</i> START-F	TACTTCCAATCCAATTTAATGCGCTACCTTGGAGTAAACCTGTTCG ATG	Non	KI- <i>Tg</i> START
KI- <i>Tg</i> START-R	TCCTCCACTTCCAATTTTAGCCCCAAATCGCTTTTCAATATGCTC	Non	KI- <i>Tg</i> START
<i>Tg</i> START-gARN-F	GCATCAGTCCTCTCCACACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	Non	Mutagénèse
SAG1-R	AACTTGACATCCCCATTTAC	Non	Mutagénèse
<i>Tg</i> START-AID-F	ATCAAAGAGCATATTGAAAAGCGATTTGGGGCTAGCAAGGGCTCG GGC	Non	KD- <i>Tg</i> START
<i>Tg</i> START-AID-R	TCTGTGAAGTTGGGAGTTGTGTCATGTTTAATACGACTCACTATAG GG	Non	KD- <i>Tg</i> START
M13-R	ACAGGAAACAGCTATGAC	Non	Séquençage de ARN guide
<i>Tg</i> START-PCR1-2_Fo	GGTAGGATACCTACAGCCAAGT	Non	Intégration de <i>Tg</i> START-AID
<i>Tg</i> START-PCR1-Rev	CACCCTTGCATATAAAGTCCT	Non	Intégration de <i>Tg</i> START-AID
AID-PCR2-Rev	GGGTCGAGCCCGAGCCCT	Non	Intégration de <i>Tg</i> START-AID

Tableau IV : Liste des plasmides et enzymes restrictions utilisées

Noms des plasmides	Enzymes de restriction
pDTS4-iKO-HA- <i>Tg</i> REMIND	Apal
pUPRT- <i>Tg</i> REMIND-Flag	EcoRV
pUPRT-F-BAR-Flag	EcoRV
pUPRT-REMIND-Flag	EcoRV
pLIC-HA-DHFR- <i>Tg</i> START	BstBI

pGEX-TgREMIND	BamHI / NCOI
pGEX-F-BAR	BamHI / NCOI
pGEX-REMIND	BamHI / NCOI

Tableau V : Liste des anticorps utilisés

Noms d'anticorps	Espèces	Dilution (IF)	Dilution (blot)	Sources
Anti TgREMIND	Souris	1/500	1/500	Tomavo Lab
Anti TgSORT	Rat	1/500	1/1000	Tomavo Lab
Anti HA	Rat	1/250	1/1000	Cell Signaling
Anti HA	Lapin	1/250	1/1000	Cell Signaling
Anti Flag	Lapin	1/1000	1/1000	Cell Signaling
Anti ROP1	Souris	1/500	1/1000	Dubremetz Lab
Anti ROP4	Lapin	1/500	1/1000	Dubremetz Lab
Anti ROP5	Lapin	1/1000	1/1000	Dubremetz Lab
Anti ROP7	Lapin	1/500	1/1000	Dubremetz Lab
Anti GRA1	Souris	1/500	1/1000	Dubremetz Lab
Anti GRA3	Lapin	1/500	1/1000	Dubremetz Lab
Anti GRA5	Souris	1/500	1/1000	Dubremetz Lab
Anti MIC2	Souris	1/500	1/1000	Carruthers Lab
Anti MIC5	Rat ou Lapin	1/500	1/1000	Carruthers Lab

Anti M2AP	Rat ou Lapin	1/500	1/1000	Carruthers lab
Pro-M2AP	Lapin	1/500	-	Carruthers lab
Pro-ROP4	Lapin	1/500	-	Carruthers lab
Anti SAG1	Souris	1/200	-	Dubremetz Lab

**PARTIE 3 : RESULTATS, DISCUSSION,
CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Partie 3 : Résultats, Discussion, Conclusion et Perspectives

RESULTATS

I- *TgREMIND*, fixateur des phosphoinositides est essentielle pour la sécrétion des organites chez *Toxoplasma gondii* et à l'infection de la cellule hôte

Les parasites *Apicomplexa* renferment plusieurs milliers gènes codant des protéines dont les fonctions biologiques ne sont pas encore étudiées. Ces protéines sont appelées des protéines hypothétiques. Chez *T. gondii*, la protéine hypothétique 25 (HP25) a été identifiée à partir de la co-immunoprécipitation de la protéine *TgVPS35* (Sangaré et al., 2016). La protéine HP25 a été nommée *TgREMIND* en raison des fonctions de ses différents domaines qui sont aussi présents chez d'autres organismes tels que les ciliés à partir desquels sont issus les *Apicomplexa*. L'extrémité N-Terminale de la protéine *TgREMIND* correspond au domaine F-BAR alors que l'extrémité C-Terminale dont la fonction est inconnue mais que nous avons nommée REMIND (*Regulator of Membrane Interacting Domain*). En effet, le domaine REMIND est similaire au SET-Binding Factor 2 (SBF2) de certaines protéines humaines et qui interagit de façon spécifique avec les protéines Rabs tout en fonctionnant comme un facteur d'échange du nucléotide guanine (Yoshimura et al., 2010). Le domaine F-BAR est connu pour son interaction avec la membrane en se liant au phospholipides tels que les PIP2 et la phosphatidylsérine (Daumke et al., 2014) ; (Suetsugu et al., 2014) pour induit la courbure membranaire (Habermann Bianca, 2004) ; (Stanishneva-Konovalova et al., 2015). F-BAR est également connu pour interagir avec les petites protéines G (GTPases) en induisant la formation des vésicules (Habermann Bianca, 2004).

TgREMIND a été identifiée par coimmunoprécipitation de *TgVPS35*, qui tout comme *TgSORT* est impliquée dans la biogenèse des rhoptries, micronèmes et granules denses chez *T. gondii* (Sloves et al., 2012) ; (Sangaré et al., 2016). Ainsi, au cours de mes travaux de recherche, il a été question de vérifier si la protéine *TgREMIND* est aussi impliquée dans la biogénèse des organites sécrétoires spécifiques chez le parasite *T. gondii*. Nous avons dans un premier temps utilisé la microscopie confocale pour montrer que *TgREMIND* est localisée dans les compartiments golgiens et post-golgien et est aussi présente au niveau d'un compartiment apparenté aux endosomes des eucaryotes supérieurs et appelé « Endosome-Like Compartement » (ELC) chez *T. gondii*. A partir de la génétique inverse et les microscopies confocale et électronique, les phénotypes du mutant iKO-*TgREMIND* sont exclusivement observés sur les organites sécrétoires spécifiques à savoir les granules denses et les rhoptries ainsi que leurs protéines GRAs et ROPs associées respectivement. En effet, nous avons observé la disparition

des granules denses en absence de la protéine *TgREMIND* chez le mutant, ce qui est lié à la perturbation de sécrétion des protéines des granules denses observée en microscopie confocale. De même en microscopie électronique, nous avons constaté un changement de la morphologie des rhoptries, ce qui a affecté la sécrétion des protéines des rhoptries chez le mutant iKO-*TgREMIND*. Par ailleurs nous avons aussi observé une incapacité des parasites mutant à se déplacer par « gliding » en absence de la protéine *TgREMIND*, ce qui est dû au défaut de la sécrétion des protéines. L'incapacité des parasites à mouvoir par glissement s'est traduit par le blocage des séries multiples d'invasion et de sortie des parasites de la lyse des cellules HFF que nous avons également observé dans en absence de *TgREMIND* dans le mutant. La protéine *TgREMIND* interagit avec plusieurs phosphatidylinositols nécessaires pour l'exocytose des protéines ainsi qu'à la formation des vésicules indispensables au trafic des protéines vers les organites spécifiques dont dépend l'invasion de la cellule hôte par *T. gondii*. Enfin, l'étude de la protéine *TgREMIND* nous a permis d'élucider le mécanisme à travers lequel *TgREMIND* est impliquée dans la régulation des fonctions des ROPs et des GRAs chez *T. gondii* et donc indispensable à la biogénèse des organites sécrétoires spécifiques puis précisément les rhoptries et les granules denses chez *T. gondii*. Ces travaux ont conduit à un manuscrit déposé sur la plateforme BioRxiv.

Article : *Toxoplasma* Membrane Inositol Phospholipid Binding Protein TgREMIND Is Essential for Secretory Organelle Function and Host Infection

Rodrigue Hounoue¹, Lamba Omar Sangare^{2, #}, Tchilabalo Dilezitoko Alayi³, Aissatou Dieng¹, Tristan Bitard-Feildel⁴, Claire Boulogne^{1,5}, Christian Slomianny⁶, Cynthia Menonve Atindehou⁷, Lucie Ayi Fanou⁷, Yetrib Hathout³, Jeroen PJ Saeij², Isabelle Callebaut⁴ and Stanislas Tomavo^{1, *}

¹ Université Paris Saclay, CNRS UMR 9198-CEA, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91190 Gif sur Yvette, France

² Department of Pathology, Microbiology, and Immunology, University of California, Davis, Davis, CA 95615, USA

³ Binghamton University, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Binghamton, New York 13902, USA

⁴ Sorbonne Université, Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, IMPMC, 75005 Paris, France.

⁵ Plateforme Imagerie-Gif, Institut de Biologie Intégrative de la cellule (I2BC) 91190 Gif sur Yvette, France

⁶ Université de Lille, INSERM U 1003, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. Villeneuve d'Ascq, France

⁷ Université d'Abomey Calavi, Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences et Technologies, Cotonou, Bénin.

#New address :

Corresponding author : stanislas.tomavo@i2bc.paris-saclay.fr

Abstract

Apicomplexan parasites harbor specialized lineage-specific secretory organelles (rhoptries, micronemes and dense granules), which have crucial functions in host infection. Here, we show that TgREMIND, a *Toxoplasma gondii* protein containing a membrane inositol phospholipid interacting domain is required for the proper function of rhoptries and dense granules. TgREMIND is cytoplasmic localized protein that partially colocalized to rhoptries and dense granules of the parasites. The N-terminus of TgREMIND contains a Fes/CIP4 homology-Bin/Amphiphysin/Rvs (F-BAR) domain known to form dimerization modules that promote cell membrane bending. The C-terminus of the protein is a new uncharacterized and named REMIND for regulator of membrane interacting domain. The presence of these two domains is necessary for binding to PIP2 lipid species. Conditional ablation of TgREMIND results in the absence of dense granules and abnormal transparent rhoptries, leading to a severe reduction of protein secreted by these crucial secretory organelles. The lack of TgREMIND inhibits parasite motility, host cell invasion and parasite dissemination. Thus, TgREMIND is essential for the functions of key secretory organelles required for infection by *Toxoplasma*.

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular eukaryotic parasite of phylum *Apicomplexa*, which also includes the deadly human pathogen such as *Plasmodium falciparum*, the causative agent of malaria. Other life-threatening apicomplexan parasites are *Eimeria*, a major pathogen of poultry; *Theileria*, responsible for cattle theileriosis; and *Cryptosporidium*, which causes a serious gastrointestinal disease. Toxoplasmosis is principally dangerous to fetuses of primo-infected pregnant women and individuals with compromised immune systems. Infection by *T. gondii* is life-long and currently incurable, leaving the 2 billion chronically infected people worldwide susceptible to reactivated disease, including severe ocular disorders and vision loss. Therefore, a better understanding of the cell biology and fundamental features of infection is key to uncovering new therapeutic strategies against *T. gondii*. Like other apicomplexan parasites, *T. gondii* after entry inside the host cell, establishes its replication permissive niche named the parasitophorous vacuole (PV) that is demarcated from the host cytoplasm by the parasitophorous vacuole membrane (PVM) (Wang et al., 2020). To successfully invade and develop inside the host cell, apicomplexan parasites possess unique morphological features that constitute the hallmark of the phylum (Morrisette and Sibley, 2002; Gubbels and Duraisingh, 2012; Tagoe et al., 2021). Among these features, the most remarkable is the presence of an apical complex composed of polar ring, conoid and lineage-specific secretory organelles named rhoptries and micronemes. During invasion, micronemes firstly release their contents that are required for motility, host cell attachment and egress (Huynh et al., 2003; Kafsack et al. 2009; Dubois and Soldati-Favre, 2019). Microneme (MIC) proteins (adhesins and escorters) form complexes that link host cell receptors to the glideosome (Opitz and Soldati, 2002). These MIC complexes are translocated backwards before their subsequent proteolysis that is essential for cell invasion progression by enabling parasite migration into host cells (Huynh et al., 2003; Brydges et al., 2006; Harper et al., 2006). Upon contact with the target cell to invade, the parasite injects directly rhoptry neck proteins (RON) residing closest to the site of ejection to establish the moving junction through association with microneme proteins, and these RON-MIC complexes are critical to efficient invasion (Alexander et al., 2005; Lamarque et al., 2011). The rhoptry bulb proteins (ROP) are released in the same secretion event to secure parasite intracellular development, survival and also subversion of other host functions such as the control of nuclear transcription and immune responses (Bradley and Sibley, 2007; Boothroyd and Dubremetz, 2008). Among these proteins, ROP18 phosphorylates and inactivates a family of host immunity related GTPases (IRGs), preserving the parasite from lysis (Tayler et al., 2006; Fentress et al., 2010; Fentress and Sibley, 2011). ROP16 interferes with signal transduction in the host nucleus through phosphorylation of the activator STAT3/6 (Saeij JP et al., 2007; Butcher et al., 2011). Dense granule proteins (GRA) are lastly secreted after PVM formation into the PV lumen from where they traffic to the PVM and host cell cytoplasm and even to the nucleus (Hakimi et al., 2017; Griffith et al., 2022). GRA proteins are involved in several functions from transfer of small molecules between host cells and PV (Gold et al., 2015; Wang et al., 2020), interference with host cell signaling (Nadipuram et al., 2016), manipulation of host cell immune response (Braun et al., 2013) and even parasite egress (LaFavers et al., 2017). Despite the key

roles that define these rhoptries, micronemes and dense granules as the pillars of the parasite survival, the underlying mechanisms involved in their biogenesis and maintenance throughout the cycle of parasite replication remain incompletely understood. The secretory organelles are synthesized *de novo* during the replication and budding of the daughter parasites formed within the mother. Except for GRA proteins, ROP and MIC proteins trafficking to rhoptries and micronemes are governed by protein enzymatic cleavage and processing of N-terminus prodomain peptides, leading to maturation and sorting through the secretory pathway and the endosomal-like compartment (ELC) when these organelles are *de novo* formed (Tomavo et al., 2013). Transport of ROP and MIC proteins and their proteolytic maturation before reaching their destined organelles depends of appropriate timing of expression, which suggests that their intracellular trafficking is directly associated to secretory organelle biogenesis (Ngo et al., 2003, Harper et al., 2006). However, little is known about how the supply of these secretory organelles with the parasite-specific factors are differentially sorted and transported at a timely coordinated and regulated fashion. We described that the formation of these vital secretory organelles of the parasite depends on the presence of *Toxoplasma gondii* Sortilin-like receptor TgSORTLR, also TgSORT (Sloves et al. 2012; Honfozo et al., 2023). TgSORT is a type I transmembrane cargo transporter located in the post-Golgi and endosome related compartments (Sloves et al., 2012). The luminal ectodomain situated at the N-terminus of the receptor binds ROP and MIC proteins while the cytosolic tail binds to the complex retromer composed of TgVps35-TgVps26-TgVps29 to 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). Both TgSORTLR and TgVsp35 are crucial for the biogenesis of secretory organelles because in their absence not only transport and maturation of ROP and MIC proteins are impaired but all three secretory organelles (rhoptries, micronemes and dense granules) are no more formed by the conditional *T. gondii* mutants (Sloves et al., 2012, Sangare et al., 2015). These observations reveal a severe inhibition of trafficking of both proteins and lipids that are required for the biogenesis of key secretory organelles, which are indispensable for parasite motility and host cell invasion. Here, we now describe a new parasite-specific protein TgREMIND, which can drive membrane bending, deformation and vesicle budding through interactions with inositol phospholipids. TgREMIND contains a highly conserved Fer-CIP4 homology-BAR (F-BAR) domain at the N-terminus and a novel yet uncharacterized REMIND for regulator of membrane interacting domain at the C-terminus, which is present in *Alveolata* and Oomycetes species, but also associated with other different functional domains in proteins of mammalian cells. The presence of both F-BAR and REMIND domains in this protein, which therefore named TgREMIND, are necessary for efficient binding to PIP2 lipid species. Conditional ablation demonstrates that the mutants devoid of TgREMIND replicate normally inside the host cell but loss dense granules and typical opaque crescent shape rhoptries, leading to the absence of secreted GRA and ROP proteins in the membrane of the parasitophorous vacuole (PVM). The lack of TgREMIND protein in these mutants led subsequently to inhibition of parasite motility and host invasion. Our findings illustrate a key role of TgREMIND, a lipid binding protein in formation and functions of secretory organelles that are required for host infection and parasite dissemination.

RESULTS

Identification of Molecular Features that Are Associated with Biological Functions of TgREMIND

We previously reported that the anterograde and retrograde transport driven by TgSORT, a homologue of mammalian sortilin, associated with TgVsp35-retromer as a functional complex located in the endosomal-like compartment is key for the biogenesis of rhoptries, micronemes and dense granules (Sloves et al., 2012; Sangare et al., 2015). Mutants lacking either TgSORT or TgVsp35 are unable to form these secretory organelles, thus suggesting that the trafficking of proteins and lipids necessary to build these organelles is impaired. In the quest to identify parasite's proteins that could interact with lipids and deform membranes, and create vesicles containing proteins/lipids destined to these secretory organelles, we extensively used computational analyses to discover TgREMIND, a new *T. gondii* regulator containing a membrane interacting domain. Initially named hypothetical protein HP25 (accession number in www.toxodb.org:TGGT1_259720), TgREMIND has been identified among more than forty hypothetical proteins with unknown functions but they were pulled down by co-immunoprecipitation as partners of TgVps35-HA using anti-HA followed by label-free quantitative mass spectrometry. Analysis of HP25 (TgREMIND) protein indicated that it is made of two foldable domains, separated by a large disordered region (Figure S1A). The sequence of the first foldable domain (aa 79-369) shares significant similarities with F-BAR domains of known 3D structures (HH-PRED E-value 8.1e-28, 9.5e-27 and 1.3e-25 with tyrosine-protein kinase Fes/Fps (pdb 4DYL), formin-binding protein 1 (pdb 2EFL) septation protein Imp2 (pdb 5C1F) F-BAR domains, respectively). This first domain matches the F-BAR (FES-CIP4 Homology and Bin/Amphiphysin/Rvs) domain of FCH domain Only 2 protein (F-BAR_FCHO2) profile of the Conserved Domain Database (cd07673, HH-PRED E-value 1.9e-31). We found this F-BAR domain in several homologues of TgREMIND that were also present in different apicomplexan parasites (Figure S2). The second foldable domain (507-825), which we named REMIND, does not share obvious similarity with sequences of known 3D structures, but its middle part (aa 588-749) matches the Pfam SET binding factor 2 (SBF2) profile (PF12335.11, HH-PRED E-value 3.4e-24). Searching the UniProt reference proteomes using PSI-BLAST led to identify significant sequence similarities between the sequences of the REMIND C-terminal region and proteins from *Alveolata* and Oomycetes species, where it is associated with an N-terminal F-BAR domain (Figures 1A and S3). The REMIND C-terminal region was also detected in other eukaryotic proteins, associated with other domain architectures, such as TBC (Tre-2, BUB2p, and Cdc16p) domains that are characteristic of Rab GAPs. It is also linked to the upstream u-DENN (differentially expressed in normal and neoplastic cells), core c-DENN and downstream d-DENN domains (characteristic of Rab GEFs) in human MADD as well in human MTMR5 and MTMR13, both members of the myotubularin-related protein family (Figures 1A and S3).

TgREMIND Resides in the Cytoplasm of *T. gondii* and Partially Colocalizes with ROP and GRA proteins

We fused the amino acid (aa₁ to aa₉₇₆) of full-length protein of TgREMIND or those encompassing the F-BAR (aa₁ to aa₃₈₆) and REMIND (aa₃₈₇ to aa₉₇₆) domains, respectively to GST for expression in *E. coli*. Purified recombinant proteins were used to produce specific mouse polyclonal antibodies. All three anti-TgREMIND, anti-F-BAR

and anti-REMIND polyclonal antibodies recognized a single band of 140 kDa (Figure S4A). We demonstrate that this 140-kDa protein is exclusively expressed in the parasites as no signal was observed in the total protein extract of uninfected human fibroblasts (HFF) (Figure 1B). However, this protein size is higher than the predicted molecular mass of TgREMIND (TGGT1_259720, see www.toxodb.org), which is estimated at 100 kDa. We have also chromosomally appended an encoded c-Myc to TgREMIND protein using knock-in strategy, which ensures steady-state levels of epitope-tagged protein expression via homologous promoters (Huyhn and Carruthers, 2009, Sangare et al., 2015). Again, a band of 140 kDa was recognized by the anti-cMyc antibodies (Figure S4B). We conclude that TgREMIND migrates as a 140 kDa in SDS-PAGE under our experimental conditions. This difference in molecular size could be due either to chemical nature and behaviour of the amino acids of TgREMIND or to the presence of series of a stretch of several 3 and 5 residues of amino acid serine at the C-terminus of the protein (Figure S1B), suggesting multiple possibilities of phosphorylation and/or O-GlcNAc acylation. We have not further investigated these aspects of post-translational modifications that are beyond the focus of the present study. Confocal imaging of intracellular parasites stained with purified anti-TgREMIND (Figure 1C) and anti-cMyc (Figure S4C) revealed labelling of the cytoplasm of *T. gondii* with a stronger signal at the apical region above the nucleus. This fluorescence appears to be in the close vicinity to TgSORT, TgVps35 and proROP4 (Figure S4C). Based on the location of different subcellular compartments and organelles of *T. gondii* drawn by the schematic representation shown in Figure 1D, TgREMIND was shown to partially codistributes with ROP1 and ROP5 protein (Figure 1E and 1F), with a strongest codistribution with ROP7 (Figure S4D). Quantification of these confocal images showed that $15 \pm 3\%$ of rhoptry ROP1 and $20 \pm 5\%$ of ROP5 protein codistributes, respectively with TgREMIND (Figure 1I). In addition, we found that $17 \pm 3\%$ of the dense granule GRA5 also partially colocalizes with TgREMIND (Figure 1G and 1I). In contrast, no colocalization was observed between microneme MA2P protein and TgREMIND (Figure 1H and 1I). Together with the presence of F-BAR domain in TgREMIND, these data suggest a close vicinity and binding of the protein to different membrane compartments of the cytoplasm of the parasites.

TgREMIND Interacts with Cellular Membrane Components and Secretory Organelles

To corroborate the observed location of TgREMIND with biochemical properties, we lysed extracellular parasites with PBS alone or PBS containing either detergent or other chaotropic agents, and separated proteins that are insoluble (P) from the soluble (S) fractions. Under these cell fractionation conditions, TgREMIND is insoluble in PBS alone and PBS containing 0.5M NaCl while the protein is partially soluble by detergent extraction (2% TritonX-100) and can be much more extracted by sodium carbonate (Na_2CO_3) (Figure 1J). In contrast, the positive control, membrane glycosyl-phospholipid anchored Surface Antigen 1 (GPI-SAG1) was more significantly extracted the detergent (Triton X-100) while the cytosolic glycolytic enzyme glucose-6 phosphate isomerase (G6-PI) was already soluble by PBS, as expected (Figure 1J). As sodium carbonate extraction is known a canonical way to distinguish integral membrane proteins from other hydrophobic moderately membrane-associated proteins (Kim et al.

2015), these data indicate that a significant amount of TgREMIND binds to subcellular membranes that are present in the cytoplasm of *T. gondii*. Using other subcellular markers of *T. gondii*, we observed a close vicinity even fewer colocalization signal for post-Golgi (ERD-GFP and GalNAcT), late endosomal-like compartment such as Rab5A-HA and Rab7-HA (Figure 1K). However, while no codistribution was found with the ER (HDEL-GFP), Golgi (GRASP-GFP) and dynamin-related compartment (DrpB-GFP), suggesting that TgREMIND is present simultaneously in distinct subcellular compartments of the cytoplasm of the parasite (Figure 1K).

To gain more insights into the nature and location of cellular membrane proteins interacting with TgREMIND, we decided to pull down its partners using the purified recombinant GST-full length TgREMIND, GST-F-BAR and GST-REMIND proteins, which were separately incubated with total protein extract prepared using Triton-X 100 lysis of extracellular purified parasites followed by mass spectrometry analyses. These experiments were independently performed at least twice to three times and comparative analyses shown as Venn diagram indicates that all three or two baits share 118 proteins (52%) of total 224 proteins pulled down whereas GST-REMIND, GST-TgREMIND and GST-F-BAR separately pulled down 19 (8%), 28 (12%) and 59 (26%) and proteins, respectively (Figure S5A). Interestingly, we identified numerous proteins, which were categorized as follows in Table S1: A) Fifty five factors involved in lipid/protein trafficking and biogenesis of vesicles and organelles such as Clathrin components, RAB5, TgSORT, TgVps35, β -COP, COP1, Coatamer protein complex, Endoplasmic reticulum lumen protein retaining receptor (ERD2) family protein, ENTH domain-containing protein, N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein, Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase, Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, Putative protein yipf5, Syntaxin 5 and 6, Sec7, Sec23/Sec24, Sec61, START domain containing protein, TBC1 domain family member 20 (Ypt/Rab-GAP domain of gyp1p); B) Twelve rhoptry (ROP) proteins, C) Twelve dense granule (GRA) proteins; D) Four microneme (MIC) proteins; E) Twenty six cytoskeleton and microtubule components (actin, myosins, tubulins and others); F) Sixty five hypothetical (HP) proteins including 12 transmembrane proteins. This functional classification of all proteins identified by mass spectrometry revealed that some of the interactors played roles in membrane traffic of vesicle membrane from ER to Golgi apparatus, recycling from ELC to post-Golgi, organelle biogenesis and cell motility in addition to regulators of membrane lipids, transporter/exchangers of membrane lipids and other trafficking vesicle formation (Table S1). These findings are also consistent with the fact that TgREMIND (TgHP25) was identified by co-immunoprecipitation of TgVsp35, an essential retromer component involved in the retrograde recycling of TgSORT, the key receptor that is crucial for the transport ROP and MIC proteins during the biogenesis of rhoptries and micronemes (Sloves et al., 2012). Indeed, numerous rhoptries and dense granule proteins were also identified by mass spectrometry analysis whereas only few microneme proteins were detected (Table S1). Altogether, these data are in a good agreement with the colocalization observed between TgREMIND with ROP and GRA proteins while no codistribution was noticed with microneme MIC proteins (Figures 1E, 1F, 1G and 4SD versus K). We conclude that TgREMIND with its membrane lipid interacting and regulator F-BAR and REMIND domains may be involved in the trafficking of vesicle biogenesis involved in the formation of rhoptries and dense granules.

TgREMIND Silencing Abrogates Secretion of ROP and GRA Proteins

To decipher the biological roles of TgREMIND, we conditionally knock-out its corresponding gene using the strategy depicted in [Figure 2A](#). We selected two positive knockout clones, which showed a perfect knock-out of endogenous target gene by the plasmid as demonstrated by PCR ([Figure 2B](#)). Upon anhydrotetracycline (ATC) treatment, we subsequently observed the disappearance of TgREMIND protein in the two knockout clones (iKO1 and iKO2) by Western blots using anti-HA antibodies ([Figure 2C](#)) and the specific mouse anti-TgREMIND antibodies ([Figure 2D](#)). We decided to further pursue our investigations with the clone iKO2 mutants, which clearly showed a total absence of the protein after 48 hours under ATC pressure. We used confocal microscopy to demonstrate that TgREMIND protein is no longer expressed in the cytoplasm of this mutant after ATc treatment ([Figure 2E](#)). To ascertain *bona fide* the phenotypic consequences that stem from the inducible targeted of TgREMIND gene ablation, we complemented this mutant with the full-length Flag-tagged-TgREMIND ([Figure 2F and 2G](#), see Comp-iKO2), which was introduced in the uracil phosphoryl transferase (UPRT) locus, as this gene is known to be non-essential for parasite survival ([Fox and Bzik, 2002](#)). We showed that this mutant was perfectly complemented as both HA-TgREMIND and TgREMIND-FLAG were simultaneously expressed in the absence of ATc ([Figure 2 Merge F+G](#), see yellow band) and only TgREMIND-Flag protein was present under ATc pressure ([Figure 2 Merge F+G](#), see red band). Under ATc pressure, TgREMIND deficiency strikingly revealed the complete absence of all five and distinct dense granule proteins (GRA1, GRA2, GRA3, GRA4 and GRA5) in the membrane of parasitophorous vacuole membrane (PVM) of the intracellular mutants ([Figure 3A, right images](#)) as compared to obvious decoration of the PVM by these GRA proteins when these mutants were intracellularly grown in the absence of ATc ([Figure 3A, left images](#)). Furthermore, we also observed a severe reduction even a complete absence of a major rhoptry ROP1 protein in the PVM of these mutants ([Figure 3B, left top and middle images](#)) while ATc-untreated displayed an abundant staining of the PVM by ROP1 ([Figure 3B, left top and middle images](#)). Complementation of the iKO-TgREMIND mutants that allows us to obtain Comp-iKOTgREMIND_Flag parasite lines (previously named Comp-iKO2 in [Figures 2F-2H](#)) fully restored the secretion of both GRA and ROP proteins into the PVM in the presence of ATc ([Figure 3C](#)). Biochemical approaches have been used to show that depletion of TgREMIND after 48 hours of ATc pressure led to reduction of secretion of GRA1 protein from extracellular mutants that were incubated with propranolol ([Bullen et al., 2016](#)), known to trigger release of GRA proteins in the extracellular medium ([Figure 4A](#)). We estimated that only 30% of GRA1 protein were recovered in the propranolol medium compared to ATc-untreated mutants ([Figure 4B](#)). In contrast, there was no difference observed in microneme MIC9 protein regardless of ATc treatment or not followed by propranolol ([Figure 4C](#)). We confirmed that the apical fluorescence pattern of three other microneme M2AP, MIC2, MIC5 was unchanged in ATc-depleted TgREMIND mutants ([Figure 4D, right panels](#)) in a manner similar to ATc-untreated mutants ([Figure 4D, left panels](#)). Confocal imaging showed that all other intracellular organelles (drawn in [Figure 1E](#)) such as the apicoplast (API), the mitochondrion (HSP60), CPL-containing organelle (known to be involved in maturation of MIC proteins), the inner membrane complex (IMC), the centriol (CEN) and plasma membrane (SAG1) were not affected by the depletion of TgREMIND protein in these mutants. Taken together, these data indicate that the suppressive effects on protein secretion into the parasitophorous vacuole membrane are only restricted and specific to dense granules

and rhoptries. Moreover, TgREMIND is a key regulator in the secretory activities of dense granules and rhoptries while its presence is not required for secretion of micronemes.

TgREMIND Is Essential for Organelle biogenesis in *T. gondii*

By analyzing a significant number of different vacuoles containing between 16 to 32 parasites, we found that the vast majority of TgREMIND-depleted mutants were devoid of dense granules as those shown in [Figure 5C and 5D](#). As expected, ATc-untreated iKO-TgREMIND parasites for the same laps of time contains the typical dense granules ([Figure 5B](#), white stars), thus suggesting that the depletion of TgREMIND clearly impacted the formation of morphologically identified electron dense granules. These data also confirmed the absence of GRA proteins secreted in the PVM of intracellular iKO-TgREMIND mutants as shown by confocal microscopy using five distinct anti-GRA antibodies ([Figure 3A](#)). In addition, we found that the electron-dense club-shaped rhoptries, which were present in the TgREMIND-depleted parasites, however, appeared with an uniformly translucent lumen ([Figure 5C](#), marked Rh) whereas the ATc-untreated iKO-TgREMIND parasites showed a lumen with electron-dense material in both their neck and bulb subcompartment ([Figure 1A and 1B](#)). These ultrastructural data also confirmed the equal presence of the flattened microneme organelles (marked Mn) in the apical end of both iKO-TgREMIND-deficient mutants and TgREMIND-expressing parasites ([Figure 5A, 5B and 5C](#)). Thus, these data clearly indicate that the absence of TgREMIND protein has no effect on microneme formation and secretion. We also observed the presence of numerous round and flattened of unknown vesicles in the lumen of parasitophorous vacuole (PV) of TgREMIND-depleted parasites as compared to ATc-untreated iKO-TgREMIND parasites, which contained none of these vesicles ([Figure 5D](#), black arrows). By screening numerous mutants and parental parasites, no morphological difference was seen for the conoid, Golgi apparatus (marked G), the endoplasmic reticulum (ER), the inner membrane complex (IMC), the plasma membrane and mitochondrion, as also indicated by the confocal imaging using specific antibodies for these classical organelles or compartments. Importantly, complementation of the iKOTgREMIND mutants rescued the presence of normal banana-electron dense rhoptries and also dense granules that were again detected in these mutants even under the pressure of ATc ([Figure 5E and 5F](#)).

Cross-talk between TgREMIND and the trafficking regulator TgSORT-TgVps35 retromer complex in *T. gondii*

As TgREMIND has been coimmunoprecipitated with TgVPS35-HA protein, we asked the question of whether the molecular basis of its action is related to those of the TgSORT and Tgvps35-retromer complex that were shown to be essential for the transport of ROP and MIC and formation of rhoptries and micronemes (Sloves et al., 2012, Sangare et al., 2015). It is worth noting that the biogenesis of dense granules was only affected in *T. gondii* mutants lacking TgVps35 (Sangare et al., 2015). It has been demonstrated that proteolytic maturation of microneme and rhoptry proteins occurs during their transport in endosome-like compartments where TgSORT and TgVps35-retromer complex also traffic through anterograde and retrograde pathways,

respectively (Harper et al., 2006; Sangare et al., 2015; Sakura et al., 2016). To investigate whether TgREMIND play any role in ROP and MIC maturation when they are routed in ELC, we performed a comparative immunoblots using total protein extracts from iKO-TgREMIND, TgSORT and TgVps35 parasites, respectively. We found no difference in proprotein processing and maturation of ROP and MIC proteins in TgREMIND-depleted parasites by ATc treatment compared to ATc-untreated TgREMIND parasites (Figure 5G, white star), suggesting that the absence of the protein have no impact in the maturation process of the proteins destined to these organelles. Otherwise, TgREMIND functions occurs upstream of the endosomal-like compartment. In constrast, we confirmed that ROP and MIC proteins were not processed to maturation when iKO-TgSORT and TgVps35 were used under the same experimental conditions, leading to a increased levels of proROP1 and proMA2P proteins in mutants under ATc pressure *versus* ATc-untreated mutants (Figures 5H and S5B, see white stars). In contrast, we observed that level of TgREMIND protein increased more than 3-fold in ATc-treated iKO-TgVps35 parasites compared to untreated mutants (Figures 5H and 5I) whereas no changes was seen in TgSORT protein level when iKO-TgREMIND parasites were analyzed (Figures 5G and 5J). The increased level of TgREMIND protein was also observed in ATc-treated iKO-TgSORT parasites (Figure S5B, see yellow stars). To assess that the increased level of TgREMIND protein observed in the total extract proteins used for immunoblotting reflected a genuine phenomenon, we created transgenic parasite line using the iKO-TgSORT parasites that were used to introduce the c-Myc tagged TgVsp35 using knock-in strategy as described above. Figure 5K showed the expression of cMyc-TgVps35 protein in the genetic background of the iKO-TgSORT parasites, which are devoid of TgSORT protein under ATc pressure, as expected (also see immunoblots in Figures 5M versus 5L). Coimmunoprecipitation of cMyc-TgVsp35 used as bait was performed with total extract of these new knock-in strain followed by semi-quantitative mass spectrometry to confirm that TgREMIND protein coimmunoprecipitated by anti-cMyc antibodies accumulated at least 3-fold level under ATc treatment *versus* untreated parasites (Figure 5N). These data provide evidence that TgVsp35 is likely a cytosolic partner of TgREMIND and in the absence of either TgVps35 protein or TgSORT protein, TgREMIND was weakly used by the parasites to perform organelle biogenesis, therefore its turn-over may be affected. Moreover, we found that in the absence of either TgVps35 protein (Figure 5P) or TgSORT (Figure S5C, right panel), TgREMIND was more dispersed in the cytoplasm of the parasite with the loss of the concentrated signal of the protein on the top of the nucleus, a subcellular region where it colocalizes with rhoptries and dense granules. In constrast, without ATc treatment, the signal of cMycTgVps35 partially coclocalizes with TgREMIND, indicating an amount of TgREMIND protein may be in close vicinity to cMycTgVps35, and it may decorate the same vesicles occupied by cMycTgVps35 (Figure 5O). As expected, TgSORT was also partially codistributed with TgREMIND in a manner similar to TgVsp35 (Figure 5C, left panels). In addition, we used Spinning Disc Confocal Microscopy coupled to Live SR module to show that fluorescence signals of TgSORT partially intersected those of TgREMIND, suggesting a cross-talk between TgSORT-TgVps35 retromer complex and TgREMIND at the endosomal-like compartment (Video S1). Interestingly, this spinning disk confocal imaging with a better resolution revealed clearly cytoplasmic vesicles that moved from ER to the TGN/ELC before

trafficking to the apical end where rhoptries and micronemes are located (Video S1). Thus, we conclude that a functional cooperation between TgREMIND and TgSORT-TVps35 retromer complex may regulate the formation of vesicles whose contents are important for biogenesis of rhoptries and dense granules whereas microneme formation occurs likely through an independent mechanistic pathway.

Both F-BAR and REMIND Domains of TgREMIND Are Required for Binding to Inositol Phospholipids and Secretory Organelle Functions

To further examine the molecular basis of TgREMIND functions in *T. gondii*, we decided to analyze the structural features of the F-BAR and REMIND domains, as provided by the AlphaFold2 (Jumper et al., 2021) 3D model of the entire TgREMIND protein (AF-S7W754). The F-BAR domain, which is predicted with very high confidence (blue color in Figure 6A), contains three long kinked α -helices that form a well-packed, crescent-shaped, symmetrical, six-helix bundle, side-by-side antiparallel homodimer. The REMIND domain is also predicted with very high (blue) to high (cyan) confidence. Searching for similarities with known 3D structure did not highlight strict structural homologs but indicated that the REMIND domains folds as a super-helix of consecutive helices (as found for instance in ENTH domains (pdb 5WF2) and includes in the loops three small beta-strands (S1 to S3) forming a short, external sheet. The secondary structures of the REMIND domain are rainbow colored from the N-terminus to the C-terminus of the domain in Figure 6B. Interestingly, the REMIND domain appears to be made of two lobes, the C-terminal one (starting at strand S7) corresponding to REMIND C-terminal region described before and showing the highest sequence conservation across the whole family (Figure S3). In addition, we illustrated the predicted AlphaFold2 models of representative members of the REMIND family (Figure S6). The REMIND C-terminal lobe (magenta) is separated for the REMIND N-terminal subdomain (light pink) by a sequence of variable length (N-C linker) that is visible as extended coils (orange) and this corresponds to disordered segments. Hence, we discovered such a very large disordered segment that links the REMIND N-terminal (aa 935-1050) and C-terminal (aa 1277-1423) lobes in the human MADD (Figure S6). This disordered linker also exists in TgREMIND protein, albeit shorter (aa 698-712). The comparison of AlphaFold2 models of REMIND domains, combined with the analysis of the multiple sequence alignment (Figure S3) also indicated that the REMIND C-terminal lobe contains a more variable region (C-lobe extension, boxed in the sequence alignment and encircled on the 3D structure models (Figure 6A)), generally modeled as long helices extending outside of the core of the globular domain. Interestingly, these local structures are predicted with high or very confidence in the AlphaFold2 models in interaction with other domains of the proteins (grey ribbons in Figures 6B (F-BAR) and S6). In TgREMIND, this region is in direct contact with the extremities of the F-BAR domains (Figures 3A and 3B), whereas in human MADD for which the C-lobe corresponds to a death domain (Schievella et al. 1997), it interacts with the Pleckstrin homology (PH)-like domain. This PH-like domain is known to bind to phosphatidylinositol lipids within biological membranes, such as PI3,4,5P2 and PI4,5P2 (Singh et al. 2021). Yet, in *T. gondii*, the REMIND domain is associated with F-BAR also known to bind to PIP2 species in the context of biological membranes including its role in inducing membrane curvature, tubulation and scission (Wang et al., 2009; Kishimoto et al., 2011). These findings suggest that the REMIND domain may have a regulatory function on the F-BAR domain, a hypothesis which has not been experimentally tested. To determine further how the REMIND domain may influence

the activity of the F-BAR domain in TgREMIND; we transiently complemented the iKO-TgREMIND mutants using plasmids expressing only the F-BAR or only REMIND domain, which were compared to the full length TgREMIND protein expression under the same experimental conditions as schematically depicted in [Figure 6C](#). When these complemented parasites were incubated with ATc to deplete the endogenous TgREMIND protein, neither F-BAR domain alone nor the REMIND are capable to rescue the secretion of ROP1 ([Figure 6D](#), middle and right panels) and GRA1 ([Figure 6E](#), middle and right panel) into the PVM of the intracellular iKO-TgREMIND depleted mutants. In contrast, complementation with the full length FL-TgREMIND perfectly restored ROP1 and GRA secretion into the PVM ([Figures 6D and 6E](#), left panels). These data clearly indicate that the presence of both F-BAR and REMIND domains are crucial for TgREMIND functions. We also fused the F-BAR, REMIND and entire TgREMIND to GST at their N-terminus ends (schematic representation in [Figure 6F](#)), which were expressed in *Escherichia coli* and purified ([Figures 6G and 6H](#)). We demonstrate that only the full-length TgREMIND binds strongly to PIP2 species with more intense binding to PI4,5P2 using lipid overlay experiments ([Figure 6I](#)). In contrast, the binding to PIP2 species by the F-BAR domain alone is extremely weak and no binding was seen for REMIND domain alone ([Figure 6I](#)), indicating that the presence of REMIND is necessary for F-BAR domain to efficiently interact with inositol phospholipids for proper membrane shaping and vesiculation.

Parasite Motility and Host Infection Are Crippled by the Absence of TgREMIND

Although transient expression was obtained for all three epitope tagged Flag to F-BAR, REMIND and FL-TgREMIND constructs, we were unable to obtain stable parasite lines with the plasmid containing the F-BAR domain alone despite several attempts and in the presence of endogenous HA-TgREMIND protein of the iKO-TgREMIND parasites. This likely confirms the essentiality of REMIND domain, which is required in association with the F-BAR to obtain alive and stable complemented parasite lines. In contrast, transgenic stable parasite lines were generated using the REMIND domain alone, suggesting that only the F-BAR domain alone appears to be toxic to *T. gondii*. Next, we examine the functional role of TgREMIND in host infection by *T. gondii*, by testing the conditional knock out mutants for host cell invasion. In the presence of ATc, iKO-TgREMIND mutants were severely impaired in their ability to invade host cells ([Figure 7A](#)). Complementation of these iKO mutants by a full-length TgREMIND protein restored their ability to invade the host cells in a manner similar the ATc-untreated mutants ([Figure 7A](#)). In sharp contrast, complementation with the REMIND domain alone, otherwise a version of protein devoid of F-BAR domain failed to efficiently complemented the iKO mutants ([Figure 7A](#)), demonstrating that both F-BAR and REMIND are essential for TgREMIND functions *in vivo*. The inability of iKO mutants to invade host cells is not linked to a default in intracellular replication of these mutants as we found that in the presence or in the absence of ATc, the iKO mutants have the same rate of multiplication into the parasitophorous vacuole ([Figure 7B](#)). Moreover, in the presence of ATc or not, there is no difference in the ability of iKO mutants to egress from the infected cells when subjected to Calcium ionophore treatment ([Figure 7C](#)). Whereas the iKO mutants showed a significant number of circular trail, otherwise a normal parasite motility in the absence of ATc ([Figure 7D](#), left panel), these mutants were paralyzed in the presence of ATc ([Figure 7D](#), middle panel). As expected, complementation by the full-length Flag-TgREMIND protein rescued the normal gliding

motility despite the presence of ATc (Figure 7D, right panel). Finally to assess the essentiality of TgREMIND in host infection, we tested the ability of parasites to form plaques on host cell monolayers, which correspond to multiple rounds of parasite entry and egress ensuring parasite dissemination and host cell lysis. Whereas the wild type parasites grew normally and developed equal sized plaques in the absence and presence of ATc, growth of iKO lines gave rise to normal plaque sizes only in the absence of ATc (Figure 7E). In the presence of ATc, plaque formation was completely blocked in TgREMIND-deficient parasites (Figure 7E). The complemented full-length TgREMIND mutants formed plaques with normal number and size plaques regardless of the presence of ATc or not (Figure 7E) and complemented REMIND devoid of F-BAR domain gave rise to very small size plaques, thus confirming that the absence of F-BAR is detrimental for the *in vivo* functions of TgREMIND in *T. gondii*.

DISCUSSION

In the present study, we describe that the TgREMIND protein, which contains F-BAR and REMIND domains, is indispensable for proper functions of rhoptries and dense granules. TgREMIND belongs to the F-BAR family, and according to modelling, the dimer crescent or banana shape form that defines this family was clearly present in the protein of *T. gondii* (Henne et al., 2007; Heath and Insall, 2008; Shimada et al., 2007; Qualmann et al., 2011). The F-BAR domain in TgREMIND is similar to the FES-CIP4 homology (FCH) domain, which is the archetypal feature of all known F-BAR proteins. (Aspenstrom, 1997). It has been demonstrated that the FCH and coiled-coil domains are structurally similar to Bin/ amphiphysin/RVS (BAR) domain (Itoh et al., 2005; Tsujita et al., 2006). These are a family of α -helical membrane-binding modules that can detect, induce and regulate membrane curvature, and thereby they play essential roles in fundamental biological processes, such as endocytosis, exocytosis, regulation of the actin cytoskeleton, cell motility and signalling (Itoh and De Camilli, 2006; Masuda et al., 2006; Shimada et al., 2007). The F-BAR family members have been identified in an ever-increasing number of pathways (Heath and Insall, 2008; Qualmann et al., 2011). Elucidation of the molecular basis of functions of the majority of F-BAR containing proteins presumably involved in multiple and distinct pathways is still in early stage. Several studies have begun to decipher the function of few individual proteins, but many issues remain to be resolved. What is the precise function of the F-BAR domain and how this is regulated by the accompanied and associated domains located at the C-terminus? Most studies have been carried out using recombinant proteins and *in vitro* model systems (Heath and Insall, 2008; Qualmann et al., 2011; Simunovic et al., 2015). Therefore, how these F-BAR containing proteins are regulated *in vivo* is an issue that remains to be addressed. Here, we carried out gene disruption and complementation studies, in combination with predictive structural and biochemical analyses to demonstrate that the F-BAR containing protein TgREMIND is essential for gliding motility, host infection and dissemination of *T. gondii*. We found that in TgREMIND-deficient parasites, the secretory organelles, rhoptries and dense granules, that contain key virulence factors are morphologically and functionally altered. We established that the presence of REMIND domain at the C-terminus in association of the F-BAR domain at the N-terminus is indispensable to ensure functions of the protein *in vivo*, likely because of the crucial roles for secretory organelles in all of these phenotypic events. We also showed that TgREMIND is

present in membrane-associated components after lysis and cell fractionation of extracellular parasites. Expression and purification of the F-BAR and REMIND domains along with the full-length protein as recombinant proteins that were tested for binding to different lipid species demonstrate that only the entire TgREMIND protein strongly interacts with PIP2 lipids *in vitro*. This supports the notion that the REMIND domain combined to the F-BAR domain act together for binding to PIP2-containing membranes that formed vesicles involved in the formation of rhoptries and dense granules. In addition, imaging by spinning disk confocal microscopy indicated that TgREMIND protein is present as punctated intracellular vesicles in different areas of the cytoplasm of the parasites. These intracellular vesicles move from the ER to TGN/ELC before reaching the apical end where rhoptries are located. These observations are consistent with the partial fluorescence codistribution of TgREMIND protein with TgSORT-TgVps35 retromer complex, which are known to be essential for the formation of all three secretory organelles, rhoptries, micronemes and dense granules (Sangaré et al., 2015). However, we found that the biological roles of TgREMIND are not linked to microneme functions. These findings indicate that biogenesis of micronemes diverges from those of rhoptries and dense granules, regarding TgREMIND-dependent pathways. In other words, other regulators and pathways that are independent from those of TgREMIND, likely drive the formation of micronemes. Interestingly, our proteomics studies also revealed numerous peripheral membrane proteins that regulate or transport lipids in addition to other trafficking factors. We also noticed the presence of several components of the cytoskeleton (actin, myosin) and microtubule proteins, which suggest that vesicles formed by TgREMIND may traffic along actin filaments or microtubules to reach their destination, as for F-BAR containing proteins in mammalian cells (Peter et al., 2004; Itoh et al., 2005; Aspenström, 2009). It is worth noting that the transport and secretion of dense granules depend on actin filaments and myosin F (Heaslip et al., 2015), and both actin and myosin F were also present in our GST pull down proteins and mass spectrometry analyses. The requirement of REMIND domain combined to F-BAR to fully complement the TgREMIND deficient mutants together with our inability to obtain viable parasite stable lines expressing the F-BAR alone suggest that TgREMIND functions must be tightly regulated in *T. gondii*. It has been described that a double C2 domain (DOC2) protein family, which is derived from an ancestral calcium (Ca^{2+}) binding archetype and ferlins (FER), also engages the C2 domain with lipids, membranes, and/or proteins to facilitate vesicular trafficking and membrane fusion (Tagoe et al., 2022). *T. gondii* ferlins 1 (FER1) and 2 (FER2) are responsible for microneme and rhoptry exocytosis, respectively, whereas an unconventional TgDOC2 that recruits the membrane fusion machinery required for exocytosis in a Ca^{2+} dependent fashion, is essential for microneme exocytosis (Farrell et al., 2012). The secretion of rhoptries is also controlled by a set of parasite specific proteins named rhoptry apical surface proteins (RASP) that cap the extremity of the rhoptry and binds specifically to phosphatidic acid (PA) and PI(4,5)P₂ through a calcium lipid-binding-like domain (C2) and a Pleckstrin Homology-(PH)-like domain (Suarez et al., 2019). TgREMIND, which also binds to PI4,5P₂ through its N-terminus F-BAR in association with the C-terminus regulator REMIND domain is involved in biogenesis and secretion of both rhoptries and dense granules. We propose a model that TgREMIND protein containing F-BAR and REMIND domains forms vesicles that drive anterograde

transport containing components such as lipids and proteins destined to rhoptries and dense granules during their biogenesis (Figure 7F). Accordingly, we show that deficits in TgREMIND function result in morphological perturbation of dense granules and rhoptries with accompanying loss in dense granule and rhoptry exocytosis (Figure 7F). However, we cannot rule out the possibility that the protein could also be involved in the recycling of vesicles as it has been co-immunoprecipitated by TgVps35-retromer known for retrograde transport. These two anterograde or retrograde pathways are not mutually exclusive as different regulatory elements may act and route TgREMIND protein toward one or the other pathway. We suggest that TgREMIND is a regulator of membrane bending, curvature and scission, thus forming vesicles containing components destined to or recycled from rhoptries and dense granules but not for micronemes whose biogenesis and secretion depend on Ca²⁺ dependent control by TgDOC2 or Ferlins (Farell et al., 2012; Coleman et al., 2018; Tagoe et al., 2022), phosphatidic acid (Bullen et al., 2016) and Rab proteins (Kremer et al., 2013). Hence, we found no physical and functional links between TgREMIND and Rab proteins. Only, Rab5 known to be associated with TgSORT and TgVps35-retromer complex functions (Sloves et al., 2012, Sangaré et al., 2016) was identified in our proteomics study using TgREMIND as baits. We also failed to demonstrate an *in vitro* binding of TgREMIND to Rab5 or Rab11 protein despite several attempts. Taken together, our data report a role for TgREMIND, a protein that binds to PI4,5P2 and possibly others PIP2 species in the biogenesis and secretion of only rhoptries and dense granules. The biogenesis of dense granules is less elucidated in *T. gondii* despite the evolution of electron microscopy and probably involves several proteins but very little known until now (Griffith et al., 2022). The formation of dense granules takes place laterally at the level of the IMC, and at the level of the TGN (Trans-Golgi Network). In addition to the GRA proteins that are essential for organelle formation in *T. gondii*, several Vps proteins TgVps11, TgVps9 and TgVps35 are crucial key factors for dense granule biogenesis (Morlon-Guyot et al. 2015; Sakura et al. 2016; Sangaré et al. 2016). Our findings that describe a role of TgREMIND that binds to membrane PIP2 lipids for possibly forming membrane curvature and vesiculation further indicate that the molecular basis of dense granule biogenesis in *T. gondii* is more complex than a simple budding of fully matured dense granules from the TGN as generally reported (Griffith et al., 2022). Our ability to conditionally extinguish TgREMIND expression and complement these mutants will allow functional dissection of the protein and its regulators that should reveal more insights in molecular basis of how F-BAR containing proteins are regulated by its adjacent C-terminus REMIND domain, which adopts a 3D structure that is predicted to contact directly the F-BAR domain in *T. gondii*. Beyond this, the TgREMIND-deficient parasites described herein underscore its roles and investigating how the protein may be regulated by a possible hyperphosphorylation of the repeated number of serines and/or O-GlcNac acylation at its C-tail may shed more insights into its functions as peripheral membrane protein binding to inositol phospholipids present in different area of the cytoplasm, thus controlling essential sorting mechanism for the biogenesis of secretory organelles in *T. gondii*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Growth of host cells and parasite strains

T. gondii RH wild-type strain, RH Δ ku80 (a strain with high homologous integration of transfected DNA; Huynh and Carruthers, 2009) and RH Δ ku80TaTi parasites, a Trans activator Trap identified inducible anhydrotetracycline (ATc) strain generated in the background of RH Δ ku80 (Sheiner et al., 2011). These parasites were maintained in monolayer human foreskin fibroblast (HFF) cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 μ g/mg penicillin/streptomycin and 10% fetal calf serum (FCS) (PAN Biotech, Dutscher, France) in a humid atmosphere under 5% CO₂ at 37°C as previously described (Slove et al., 2012).

Generation of *Tg*REMIND Knockout and Knock-in *T. gondii* Strains

To obtain the conditional iKO-*Tg*REMIND in *T. gondii* RH Δ ku80-TaTi strain, we used the pyrimethamine-resistant plasmid pG13-D-T7S4 that contains the inducible promoter TeTo7-Sag4. First, we amplified by PCR, 2 kb of 5'-DNA fragment of *Tg*REMIND, which was cloned into NdeI restriction enzyme site. After verification of the right orientation using StuI/EcoRV, we cloned the 1.3 kb 3'-DNA fragment of *Tg*REMIND that contains an epitope HA downstream of the inducible promoter. All oligonucleotides used during this work were listed in [Table S1](#) (see [Supplemental Information](#)). Fifty μ g of this plasmid was linearized with EcoRV and used to transfect 10⁷ tachyzoites of RH Δ ku80-TaTi that were selected with 2 μ M of pyrimethamine before cloning by limiting dilution to obtain the conditional iKO-HA-*Tg*REMIND mutants. To complement these mutants, we used the pUPRT (Uracil PhosphoRibosyl Transferase) plasmid, in which either 2 kb of *Tg*REMIND, 1 kb of Tubulin or 1.5 kb of GRA1 promoter was respectively cloned downstream of the 5'UPRT using AscI/StuI. Then, the full-length of *Tg*REMIND (2928bp) tagged to epitope Flag using StuI/AvrII. Finally, the 3'SAG1 untranslated region (350bp) was cloned upstream of the 3'UPRT region using AvrII/PacI. This later plasmid was used to subcloned and replaced the DNA coding full length *Tg*REMIND by the 1.15 kb or 1.77 kb of DNA coding respectively the N-terminus F-BAR and C-terminus REMIND domains with all tagged to the epitope Flag using StuI/AvrII. After co-transfection of 10⁷ iKO-HA-*Tg*REMIND parasites of the aforementioned linearized 50 μ g of each linearized plasmids to which 10 μ g of pSAG1::CAS9-U6::sgUPRT was added to favor high rate of homologous recombination into UPRT locus (Sidik et al., 2016). Twenty hour later, the cotransfected parasites were incubated with 5 μ M of 5-fluoro-2'-deoxyuridine (5' FUDR) and the stable parasite lines obtained were cloned by limiting dilution and after screening by indirect immunofluorescence assays (IFA) using anti-HA or anti-Flag, the positive clones were selected. To obtain cMyc tagged *Tg*REMIND protein by knock in strategy, the DNA fragment amplified by PCR using the primers listed in Supplementary Table 1 was cloned as previously described (Sangare et al., 2016).

Immunofluorescence Assays

Paraformaldehyde-fixed intracellular parental RH Δ ku80-TaTi and iKO HA-*Tg*REMIND mutants treated or not with 1.5 μ g/ml of anhydrotetracycline (ATc) were used for

immunofluorescence assays. The list of monoclonal and polyclonal antibodies used and their dilutions are listed in [Table S2 \(Supplemental Information\)](#). Alexa Fluor secondary antibodies (488 nm, 568 nm, 594 nm) from either Rat, Rabbit or Mouse chosen depending of the nature of primary antibodies used at 1:1000 dilutions. In some cases, when a specific primary antibody was not available, we transiently transfected 5×10^6 tachyzoites with plasmids expressing different markers of subcellular compartments such as ELC (Rab5-HA and Rab7-HA), endoplasmic reticulum (HDEL-GFP), ER/post-Golgi (ERD-GFP), post-Golgi (GalNacT-GFP) and dynamin-containing compartment (DrpB-YFP (Breinich et al., 2009)). The antibodies specific to HA or anti-GFP was used to amplify the fluorescence, then anti-TgREMIND and mouse secondary antibodies were used for codistribution studies.

Confocal laser scanning microscopy

The acquisition of fluorescence images were performed using the Leica SP8-X (Leica DMI 6000) microscope with a 63x objective. ImageJ was used for image processing Pearson's coefficient in ImageJ for quantification from 4 to 6 vacuoles each containing between 4 to 16 parasites.

Confocal Spinning Disc Microscopy

IFA images were also obtained using the Inverted Nikon Ti Eclipse Eclipse-E microscope coupled with a spinning disk (Yokogawa, CSU-X1-A1), a 100x plan apo objective (Nikon, NA 1.49, oil immersion) and a sCMOS camera (Photometrics, Prime 95B). An additional "Live-SR" module (GATACA systems) was added to increase two fold the resolution. DAPI fluorescence was detected after a 405 nm excitation (Vortran, 100 mW laser) with a 450/50 bandpass filter (Chroma). Alexa 488 was detected after a 488nm excitation (Vortran, 150mW laser) with a 524/45 bandpass filter (Semrock). Alexa 568 was detected after a 561nm excitation (Coherent, 100mW laser) with a 607/36 bandpass filter (Semrock). The whole system was driven by Metamorph (version 7.7, Molecular Devices).

Electron microscopy

Ultrastructure morphology of intracellular parasites were fixed at room temperature for 1h in 0.1 M sodium cacodylate buffer containing 2.5% glutaraldehyde. Then, samples were kept overnight at 4°C. After washing with the same buffer, samples were fixed again in aqueous 1% osmium tetroxide and 1.5% potassium ferrocyanide. After, successive dehydration in ethanol, samples were embedded in Epon (Agar Scientific, AGR1165): 2h in resin mixed with ethanol, and 2h with pure resin before polymerisation 24h at 60°C. 70nm-sections were cut using an ultramicrotome LEICA UC6, collected on grids, and contrasted 15min in 2% aqueous uranyl acetate and 2min in Reynold's lead citrate. Ultrastructural images were collected using a JEOL1400 transmission electron microscope at 80kV and camera RIO9.

Production of Recombinant proteins fused to Glutathione S-Transferase (GST)

The full length of TgREMIND DNA sequence and those of its N-terminus F-BAR and C-terminus REMIND domains were synthesized and cloned into the pGEX plasmid by GenScript using the restriction enzymes BamHI and NcoI. BL21 DE3 *Escherichia coli*

(Biolabs) were used to transform and produce the recombinant proteins. Pre-cultures of 10 ml grown in the presence of ampicillin (100 µg/ml) at 37°C overnight were transferred to one-liter cultures, which were incubated at 37°C for 4 to 5 hours OD₆₀₀ of 0.6. Production of these recombinant proteins were induced with 0.2 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 20°C overnight, and checked by SDS-PAGE. Next, cultures were centrifuged at 6000xg at 4°C for 15 min and pellets were frozen at -80°C for at least 2 h before lysis in 50 mM Tris-HCl pH 8 buffer, 250 mM NaCl, 5% glycerol and 0.1% Triton X-100 supplemented with 1X protease inhibitors, 1 mg/ml lysozyme, 5 mM DTT and 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). After incubation for 30 min on ice, bacteria were lysed by 6 cycles of sonication (30 s pulse at 90% and 20 s pause), and centrifuged at 2000 rpm and 4°C. The supernatants were incubated with GST column overnight at 4°C with 5mM ATP and 1 mM PMSF. Two series of washes were performed at pH 7.5 with two different washing buffers: 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 5 mM DTT and 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM DTT. Finally, recombinant proteins were eluted for 10 min at 4°C using 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM GSH (glutathione), 5 mM DTT and 0.5 mM PMSF buffer. The eluates were dialyzed and concentrated by Amicon system before SDS-PAGE and Coomassie blue staining.

GST Pull down and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

To identify *Tg*REMIND partners, 10⁹ tachyzoites of RH strain were lysed for 1 h at 4°C under rotary shaking in a buffer containing 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂, 1% Triton X-100 and protease inhibitors. The lysate was centrifuged at 10000 rpm for 30 minutes at 4°C, and supernatants were incubated with 100 µg of each recombinant protein GST-*Tg*REMIND, GST-F-BAR, GST-REMIND coupled to GST beads or with GST alone (negative control) at 4°C overnight. Five washings were performed with lysis buffer. Eluates were analyzed by SDS-PAGE and protein bands were processed using LC-MS/MS as described in [Supplemental Experimental Procedures](#).

Cell Fractionation

Extracellular parasites that were freshly egressed of wild type of *T. gondii* RHΔku80 (10⁸ tachyzoites) were purified to remove HFF debris, pelleted and washed once with PBS as described (Breinich et al., 2009). Each pellet was resuspended with 300 µl of each different lysis buffers as follows: PBS 1x, 2% Triton X-100 in 1x PBS, 1M NaCl in 1x PBS and 0.1 M Na₂CO₃ in PBS 1x at pH 11.5. After lysis by three series of rapid freezing in liquid nitrogen and thawing in water bath at 37°C, homogenates were obtained by sonication. The different homogenates underwent ultracentrifugation at 100,000xg at 4°C to separate into different soluble and insoluble fractions. Fractions equivalent to 1x10⁷ parasites were analyzed by SDS-PAGE followed by immunoblots using specific anti-*Tg*REMIND, anti-Glycosyl Phosphoribosyl Inositol (GPI) anchored SAG1 and anti-G6-PI (glucose 6-phosphate isomerase) antibodies.

Microneme Secretion and Dense Granule Excretion

Freshly egressed (2x10⁸ parasites) ATc-treated (1.5 µg/ml) or untreated iKO-*Tg*REMIND mutants for 48 h were harvested by centrifugation at 600 x g for 10 min at

room temperature, and washed twice with prewarmed at 37°C of intracellular buffer containing 5 mM NaCl, 142 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 5.6 mM glucose and 25 mM HEPES, pH 7.2). After centrifugation, parasites were resuspended in DMEM supplemented with 2 mM glutamine containing 500 µM of propranolol or not, and incubated for 20 min at 37 °C (Bullen et al., 2016). Parasites were centrifuged at 1000 × g, 4 °C for 5 min. Pellets were washed once in PBS and resuspended in Laemmli bufer. Supernatants were centrifuged at 2000 × g for 5 min, 4 °C and supernatants used as ESA (Excreted/Secreted Antigen) were also suspended in 2XLaemmli buffer. Pellets and ESA samples were run on SDS-PAGE and analysed for the presence of dense granule GRA1 and microneme MIC9 by Western blots.

Coimmunoprecipitations, SDS-PAGE and Western Blots

For coimmunoprecipitations, 2x10⁸ parasites from transgenic knocked in of cMyc-TgVps35 into iKO-TgSORT mutants freshly egressed after ATc-treatment or not for 48h were purified and extracted with Triton X-100 as described (Fauquenoy et al., 2011). Binding protein complexes of coimmunoprecipitations or total protein extracts of purified parasites were electrophoresed on SDS-PAGE, transferred at 80 V for 1 h 15 min onto nitrocellulose membrane in a cold buffer containing 25 mM Tris-HCl, 190 mM glycine and 20% methanol in a cold room. After 5 min of 0.2% ponceau red staining, water rinsed membranes were saturated with 5% skim milk prepared in TNT buffer (15 mM Tris-HCl pH 8; 140 mM NaCl; 0.05% Tween-20) for 30 min at room temperature. The primary antibodies used were listed in [Table S2](#). The secondary peroxidase-coupled antibodies (Sigma) or Alexa fluor 488 nm or 594 nm antibodies (Invitrogen) prepared in TNT were incubated for 1 h at room temperature. Following three washes with TNT, peroxidase-coupled secondary antibodies were revealed with ECL (Enhanced ChemiLuminescence Plus Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences) whereas the Alexa fluor antibodies scanned using VILBER FUSION FX imaging system (France).

Gliding Assay and Host Cell Invasion

Trail deposition assays were performed as previously described (Fauquenoy et al., 2008). ATc-treated iKO-TgREMIND, and ATc-treated complemented Comp-KO-TgREMIND parasites for 48h were purified and pellets were resuspended with incomplete DMEM medium supplemented with 10 mM HEPES and 1 mM EGTA. Parasites (5.10⁶ tachyzoites) were plated on glass coverslips previously treated with 50% FCS at 37°C overnight. After 20 minutes of incubation at 37°C under 5% CO₂, parasites were fixed with 4% PFA. Gliding trails were observed under a Zeiss fluorescence microscope after staining with SAG1 antibodies. For host cell invasion, iKO-TgREMIND, Comp-full length TgREMIND_Flag and Comp-REMIND_Flag were

treated or not with ATc for 48h. Freshly egressed parasites were used to infect confluent HFF cells and processed as described (Sangare et al., 2015).

Plaque assays

Plaque assays were carried out as previously described (Sloves et al., 2012), except that the coverslip containing confluent HFF cells were infected with 500 iKO-TgREMIND, Comp-iKO-TgREMIND, Comp-REMIND and RHTaTi. After 3h post-infection, 1.5 µg/ml of ATc was added or not to these infected HFF coverslips and incubated for seven days. Infected HFF cells were fixed with cold methanol on ice for 10 min before staining with crystal violet at room temperature for 10 min. After, three washing with distilled water, the coverslips were air-dried before imaging.

Bioinformatics analyses

Sequences were extracted from the UniProt database (UniProt consortium, 2021). AlphaFold2 (AF2) (Jumper et al. 2021) models were extracted from the AFDB database (Varadi et al. 2022). Sequence similarities were initially searched against UniProt using PSI-BLAST (Altschul et al. 1997). The JackHMMER software (Finn et al. 2015) was also used with as query the initial REMIND domain alignment and as target the UniProt reference proteomes with default parameters. HH-PRED (Zimmermann et al. 2018) was used to search protein domain and structure databases. Comparison of 3D structures against those included in the Protein Data Bank (PDB) was performed using DALI (Holm 2022). 3D structures were visualized with the UCSF Chimera package (Pettersen et al. 2004). Sequence alignment were rendered using ESPript (Robert and Gouet 2014).

Statistical analysis

We analysed all the data with GraphPad9 software and statistical studies were performed using ANOVA one-way or two-way that followed by Tukey's multiple comparisons test.

Acknowledgments:

We would like to thank Drs Vern Carruthers (University of Michigan, USA) and David Sibley for kindly providing several polyclonal antibodies specific to MIC and ROP proteins. We are also grateful to Omar Ndao and Scott Thomas for their technical assistance, and to other members of the lab, Ariane Honfozo, Mahamadou Konaté and Mahendra Jamdhade for their help and fruitful discussions. Financial support for this work was provided by the Agence Nationale de la Recherche grants N° ANR-14-CE14-0002-01 and N° ANR-19-CE44-0006 to ST. RH was supported by the International Eiffel (Campus France) and the UMEOA fellowships.

Competing Interests Statement

The authors declare that they have no competing financial interests.

Author Contributions

The author(s) have made the following declarations about their contributions:

Conceived and designed the experiments:

ST

Performed the experiments:

RH, OS, TBF, AD, CB
Contributed reagents/materials/analysis tools:
TBF, IC, CS, CMA, LAF, YH
Performed data analysis:
CB, CS, IC, YH, ST
Wrote the paper:
IC, JPJS, ST

REFERENCES

- Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. PLoS Pathog. 2005 Oct;1(2):e17. doi: 10.1371/journal.ppat.0010017.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1;25(17):3389-402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389.
- Aspenström P. Roles of F-BAR/PCH proteins in the regulation of membrane dynamics and actin reorganization. Int Rev Cell Mol Biol. 2009;272:1-31. doi: 10.1016/S1937-6448(08)01601-8.PMID: 19121815
- Boothroyd JC, Dubremetz JF. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. Nat Rev Microbiol. 2008 Jan;6(1):79-88. doi: 10.1038/nrmicro1800.
- Bradley PJ, Sibley LD. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. Curr Opin Microbiol. 2007 Dec;10(6):582-7. doi: 10.1016/j.mib.2007.09.013.
- Braun, L.; Brenier-Pinchart, M.P.; Yogavel, M.; Curt-Varesano, A.; Curt-Bertini, R.L.; Hussain, T.; Kieffer-Jaquinod, S.; Coute, Y.; Pelloux, H.; Tardieux, I.; et al. A *Toxoplasma* dense granule protein, gra24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 mapk activation. *J. Exp. Med.* 2013, 210, 2071–2086.
- Breinich MS, Ferguson DJ, Foth BJ, van Dooren GG, Lebrun M, Quon DV, Striepen B, Bradley PJ, Frischknecht F, Carruthers VB, Meissner M. A dynamin is required for the biogenesis of secretory organelles in *Toxoplasma gondii*. Curr Biol. 2009 Feb 24;19(4):277-86. doi: 10.1016/j.cub.2009.01.039
- Brydges SD, Zhou XW, Huynh MH, Harper JM, Mital J, Adjogble KD, Däubener W, Ward GE, Carruthers VB. Targeted deletion of MIC5 enhances trimming proteolysis of *Toxoplasma* invasion proteins. Eukaryot Cell. 2006 Dec;5(12):2174-83. doi: 10.1128/EC.00163-06. Epub 2006 Sep 15.
- Bullen HE, Jia Y, Yamaro-Botté Y, Bisio H, Zhang O, Jemelin NK, Marq JB, Carruthers V, Botté CY, Soldati-Favre D. Phosphatidic acid-mediated signaling regulates microneme secretion in *Toxoplasma*. Cell Host Microbe. 2016 Mar 9;19(3):349-60. doi: 10.1016/j.chom.2016.02.006.
- Butcher BA, Fox BA, Rommereim LM, Kim SG, Maurer KJ, Yarovinsky F, Herbert DR, Bzik DJ, Denkers EY. *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and

STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. *PLoS Pathog.* 2011 Sep;7(9):e1002236. doi: 10.1371/journal.ppat.1002236.

Coleman BI, Saha S, Sato S, Engelberg K, Ferguson DJP, Coppens I, Lodoen MB, Gubbels MJ. A Member of the Ferlin calcium sensor family is essential for *Toxoplasma gondii* rhoptry secretion. *mBio.* 2018 Oct 2;9(5):e01510-18. doi: 10.1128/mBio.01510-18.

Dubois DJ, Soldati-Favre D. Biogenesis and secretion of micronemes in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.* 2019 May;21(5):e13018. doi: 10.1111/cmi.13018.

Farrell, A., Thirugnanam, S., Lorestani, A., Dvorin, D. J., Eidell, K. P., David J.P. Ferguson, J.P.D., Anderson-White, B.R., Duraisingh, M.T., Gabor T. Marth, G.T., Gubbels M-J. A DOC2 protein identified by mutational profiling is essential for Apicomplexan parasite exocytosis. *Science.* 2012 Jan 13; 335(6065): 218–221. doi: 10.1126/science.1210829

Fauquenoy S, Morelle W, Hovasse A, Bednarczyk A, Slomianny C, Schaeffer C, Van Dorsselaer A, Tomavo S. Proteomics and glycomics analyses of N-glycosylated structures involved in *Toxoplasma gondii*-host cell interactions. *Mol Cell Proteomics.* 2008 May;7(5):891-910. doi: 10.1074/mcp.M700391-MCP200.

Fentress SJ, Behnke MS, Dunay IR, Mashayekhi M, Rommereim LM, Fox BA, Bzik DJ, Taylor GA, Turk BE, Lichti CF, Townsend RR, Qiu W, Hui R, Beatty WL, Sibley LD. Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell Host Microbe.* 2010 Dec 16;8(6):484-95. doi: 10.1016/j.chom.2010.11.005.

Fentress SJ, Sibley LD. The secreted kinase ROP18 defends *Toxoplasma*'s border. *Bioessays.* 2011 Sep;33(9):693-700. doi: 10.1002/bies.201100054.

Fox, B.A. and Bzik, D.J. De novo pyrimidine biosynthesis is required for virulence of *Toxoplasma gondii*. *Nature.* 2002 Feb 21;415(6874):926-9. doi: 10.1038/415926a.

Finn RD, Clements J, Arndt W, Miller BL, Wheeler TJ, Schreiber F, Bateman A, Eddy SR. HMMER web server: 2015 update. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jul 1;43(W1):W30-8. doi: 10.1093/nar/gkv397.

Gold, D.A.; Kaplan, A.D.; Lis, A.; Bett, G.C.; Rosowski, E.E.; Cirelli, K.M.; Bougdour, A.; Sidik, S.M.; Beck, J.R.; Lourido, S.; et al. The *Toxoplasma* dense granule proteins gra17 and gra23 mediate the movement of small molecules between the host and the parasitophorous vacuole. *Cell Host Microbe* 2015, 17, 642–652.

Griffith MB, Pearce CS, Heaslip, AT. Dense granule biogenesis, secretion, and function in *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol.* 2022 Nov;69(6):e12904. doi: 10.1111/jeu.12904.

Gubbels, M-J, Duraisingh, M. T. Evolution of apicomplexan secretory organelles. *Int J Parasitol.* 2012 Nov; 42(12): 1071–1081. Published online 2012 Oct 13. doi:10.1016/j.ijpara.2012.09.009

Hakimi MA, Olias P, Sibley LD. *Toxoplasma* effectors targeting host signaling and transcription. *Clin Microbiol Rev.* 2017 Jul;30(3):615-645.

Harper JM, Huynh MH, Coppens I, Parussini F, Moreno S, Carruthers VB. A cleavable propeptide influences *Toxoplasma* infection by facilitating the trafficking and secretion of the TgMIC2-M2AP invasion complex. *Mol Biol Cell.* 2006 Oct;17(10):4551-63. doi: 10.1091/mbc.e06-01-0064. Epub 2006 Aug 16.

Heath RJ, Insall RH. F-BAR domains: multifunctional regulators of membrane curvature. *J Cell Sci.* 2008 Jun 15;121(Pt 12):1951-4. doi: 10.1242/jcs.023895.PMID: 18525024

Henne WM, Kent HM, Ford MG, Hegde BG, Daumke O, Butler PJ, Mittal R, Langen R, Evans PR, McMahon HT. Structure and analysis of FCHo2 F-BAR domain: a dimerizing and membrane recruitment module that effects membrane curvature. *Structure.* 2007 Jul;15(7):839-52. doi: 10.1016/j.str.2007.05.002. Epub 2007 Jun 1.PMID: 17540576

Honfozo, A., Ghouil, R., Dilezitoko Alayi T., Ouldali M, Arteni A-A, Atindehou MC, Ayi Fanou L, Hathout Y, Zinn-Justin S, Tomavo S (2023) The luminal domain of *Toxoplasma gondii* sortilin adopts a ring-shaped structure exhibiting motifs specific to apicomplexan parasites. *Frontiers in Parasitology, section Molecular Cellular Parasitology.* 2: <https://doi.org/10.3389/fpara.2023.1103772>.

Itoh T, Erdmann KS, Roux A, Habermann B, Werner H, De Camilli P. Dynamins and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev Cell.* 2005 Dec;9(6):791-804. doi: 10.1016/j.devcel.2005.11.005.PMID: 16326391

Itoh T, De Camilli P. BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Aug;1761(8):897-912. doi: 10.1016/j.bbali.2006.06.015.

Holm L. Dali server: structural unification of protein families. *Nucleic Acids Res.* 2022 May 24;50(W1):W210–5. doi: 10.1093/nar/gkac387.

Huynh, M-H., Rabenau K.E., Harper, J. M.; Beatty, W. L., Sibley, L. D., Carruthers, V. B. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. *EMBO J* 2003 May 1;22(9):2082-90.

Huynh MH, Carruthers VB. Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain lacking Ku80. *Eukaryot Cell.* 2009 Apr;8(4):530-9. doi: 10.1128/EC.00358-08.

Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021 Aug;596(7873):583-589. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.

- Kafsack BF, Pena JD, Coppens I, Ravindran S, Boothroyd JC, Carruthers VB. Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science*. 2009 Jan 23;323(5913):530-3. doi: 10.1126/science.1165740
- Kim H., Botelho C. S. , Park K., Kim H. Use of carbonate extraction in analyzing moderately hydrophobic transmembrane proteins in the mitochondrial inner membrane. *Protein Sci*. 2015 Dec;24(12):2063-9. doi: 10.1002/pro.2817. Epub 2015 Nov 6.
- Kishimoto T, Sun Y, Buser C, Liu J, Michelot A, Drubin DG. Determinants of endocytic membrane geometry, stability, and scission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Nov 1;108(44):E979-88. doi: 10.1073/pnas.1113413108. Epub 2011 Oct 17. PMID: 22006337
- Kremer, K., Kamin, D., Rittweger, E., Wilkes, J., Flammer, H., Mahler, S., Heng, J., Tonkin, C. J., Langsley, G., Hell, W. S., Carruthers, V. B., David J P Ferguson, D. J. P., and Meissner, M. An overexpression screen of *Toxoplasma gondii* Rab-GTPases reveals distinct transport routes to the micronemes. *PLoS Pathog* 2013 Mar;9(3): e1003213. doi: 10.1371/journal.ppat.1003213.
- LaFavers, K.A.; Marquez-Nogueras, K.M.; Coppens, I.; Moreno, S.N.J.; Arrizabalaga, G. A novel dense granule protein, gra41, regulates timing of egress and calcium sensitivity in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol*. 2017, 19.
- Lamarque M, Besteiro S, Papoin J, Roques M, Vulliez-Le Normand B, Morlon-Guyot J, Dubremetz JF, Fauquenoy S, Tomavo S, Faber BW, Kocken CH, Thomas AW, Boulanger MJ, Bentley GA, Lebrun M. The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathog*. 2011 Feb 10;7(2):e1001276. doi: 10.1371/journal.ppat.1001276
- Masuda, M., Takeda, S., Sone, M., Ohki, T., Mori, H., Kamioka, Y. and Mochizuki, M. (2006). Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. *EMBO J*. 25, 2889-2897.
- Morrisette, N. S., Sibley, L. D. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002 Mar;66(1):21-38; doi: 10.1128/MMBR.66.1.21-38.2002.
- Morlon-Guyot J, Pastore S, Berry L, Lebrun M, Daher W. *Toxoplasma gondii* Vps11, a subunit of HOPS and CORVET tethering complexes, is essential for the biogenesis of secretory organelles. *Cell Microbiol*. 2015 Aug;17(8):1157-78. doi: 10.1111/cmi.12426.
- Nadipuram SM, Kim EW, Vashisht AA, Lin AH, Bell HN, Coppens I, Wohlschlegel JA, Bradley PJ. In vivo biotinylation of the *Toxoplasma* parasitophorous vacuole reveals novel dense granule proteins important for parasite growth and pathogenesis. *mBio*. 2016 Aug 2;7(4): e00808-16. doi: 10.1128/mBio.00808-16.
- Ngo, N. H., Yang, M., Paprotka, K., Pypaert, M., Hoppe, H., and Joiner, K.A. (2003) AP-1 in *Toxoplasma* mediates biogenesis of the rhoptry secretory organelle from a post-Golgi compartment. *J. Biol. Chem*. 278, 5343-5352.
- Nielsen MS, Madsen P, Christensen EI, Nykjaer A, Gliemann J, Kasper D, Pohlmann R, Petersen CM. The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and

binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. EMBO J. 2001 May 1;20(9):2180-90. doi: 10.1093/emboj/20.9.2180.

Opitz C, Soldati D. The glideosome: a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. Mol Microbiol. 2002 Aug;45(3):597-604. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03056.x.

Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J., Evans, P. R. and McMahon, H. T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. Science 303, 495-499.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem. 2004 Oct;25(13):1605-12. doi: 10.1002/jcc.20084. PMID: 15264254.

Qualmann B, Koch D, Kessels MM. Let's go bananas: revisiting the endocytic BAR code. EMBO J. 2011 Aug 31;30(17):3501-15. doi: 10.1038/emboj.2011.266.PMID: 21878992

Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. Nucleic Acids Res. 2014 Jul;42(Web Server issue):W320-4. doi: 10.1093/nar/gku316.

Sangaré LO, Alayi TD, Westermann B, Hovasse A, Sindikubwabo F, Callebaut I, Werkmeister E, Lafont F, Slomianny C, Hakimi MA, Van Dorsselaer A, Schaeffer-Reiss C, Tomavo S. Unconventional endosome-like compartment and retromer complex in *Toxoplasma gondii* govern parasite integrity and host infection. Nat Commun. 2016 Apr 11;7:11191. doi: 10.1038/ncomms11191.

Saeij JP, Coller S, Boyle JP, Jerome ME, White MW, Boothroyd JC. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. Nature. 2007 Jan 18;445(7125):324-7. doi: 10.1038/nature05395.

Sakura T, Sindikubwabo F, Oesterlin LK, Bousquet H, Slomianny C, Hakimi MA, Langsley G, Tomavo S. A critical role for *Toxoplasma gondii* vacuolar protein sorting VPS9 in secretory organelle biogenesis and host infection. Sci Rep. 2016 Dec 14;6:38842. doi: 10.1038/srep38842.

Schievella AR, Chen JH, Graham JR, Lin LL. MADD, a novel death domain protein that interacts with the type 1 tumor necrosis factor receptor and activates mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem. 1997 May 2;272(18):12069-75. doi: 10.1074/jbc.272.18.12069. PMID: 9115275.

Sheiner L, Demerly JL, Poulsen N, Beatty WL, Lucas O, Behnke MS, White MW, Striepen B. A systematic screen to discover and analyze apicoplast proteins identifies a conserved and essential protein import factor. PLoS Pathog. 2011 Dec;7(12):e1002392. doi: 10.1371/journal.ppat.1002392.

Shimada, A., Niwa, H., Tsujita, K., Shetsugu, S., Nitta, K., Hanawa-Suetsugu, K., Akasaka, R., Nishino, Y., Toyama, M., Chen, L. et al. (2007). Curved EFC/F-BAR domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis. Cell 129, 761- 772.

Sidik SM, Huet D, Ganesan SM, Huynh MH, Wang T, Nasamu AS, Thiru P, Saeij JPJ, Carruthers VB, Niles JC, Lourido S. A genome-wide CRISPR screen in *Toxoplasma* identifies essential Apicomplexan genes. *Cell*. 2016 Sep 8;166(6):1423-1435.e12. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.019

Simunovic M, Voth GA, Callan-Jones A, Bassereau P. When physics takes over: BAR proteins and membrane curvature. *Trends Cell Biol*. 2015 Dec;25(12):780-792. doi: 10.1016/j.tcb.2015.09.005. Epub 2015 Oct 28.

Singh N, Reyes-Ordoñez A, Compagnone MA, Moreno JF, Leslie BJ, Ha T, Chen J. Redefining the specificity of phosphoinositide-binding by human PH domain-containing proteins. *Nat Commun*. 2021 Jul 15;12(1):4339. doi: 10.1038/s41467-021-24639-y. PMID: 34267198

Sloves PJ, Delhaye S, Mouveaux T, Werkmeister E, Slomianny C, Hovasse A, Dilezitoko Alayi T, Callebaut I, Gaji RY, Schaeffer-Reiss C, Van Dorsselear A, Carruthers VB, Tomavo S. *Toxoplasma* sortilin-like receptor regulates protein transport and is essential for apical secretory organelle biogenesis and host infection. *Cell Host Microbe*. 2012 May 17;11(5):515-27. doi: 10.1016/j.chom.2012.03.006.

Suarez C, Lentini G, Ramaswamy R, Maynadier M, Aquilini E, Berry-Sterkers L, Cipriano M, Chen AL, Bradley P, Striepen B, Boulanger MJ, Lebrun M. A lipid-binding protein mediates rhoptry discharge and invasion in *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* parasites. *Nat Commun*. 2019 Sep 6;10(1):4041. doi: 10.1038/s41467-019-11979-z.

Tagoe, D. N. A, Drozda, A. A. Falco, J. A., Bechtel, T. J., Weerapana, E., Gubbels, M-J. Ferlins and TgDOC2 in *Toxoplasma* Microneme, Rhoptry and Dense Granule Secretion. *Life (Basel)* 2021 Mar;11(3): 217. Published online 2021 Mar 9. doi: 10.3390/life11030217

Taylor S, Barragan A, Su C, Fux B, Fentress SJ, Tang K, Beatty WL, Hajj HE, Jerome M, Behnke MS, White M, Wootton JC, Sibley LD. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science*. 2006 Dec 15;314(5806):1776-80. doi: 10.1126/science.1133643.

Tomavo S, Slomianny C, Meissner M, Carruthers VB. Protein trafficking through the endosomal system prepares intracellular parasites for a home invasion. *PLoS Pathog*. 2013 Oct;9(10): e1003629. doi: 10.1371/journal.ppat.1003629.

Tsujita K, Suetsugu S, Sasaki N, Furutani M, Oikawa T, Takenawa T. Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J Cell Biol*. 2006 Jan 16;172(2):269-79. doi: 10.1083/jcb.200508091.

UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan 8;49(D1):D480-D489. doi: 10.1093/nar/gkaa1100.

Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, Yuan D, Stroe O, Wood G, Laydon A, Židek A, Green T, Tunyasuvunakool K, Petersen S, Jumper J, Clancy E, Green R, Vora A, Lutfi M, Figurnov M, Cowie A, Hobbs N, Kohli P, Kleywegt

G, Birney E, Hassabis D, Velankar S. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* 2022 Jan 7;50(D1):D439-D444. doi: 10.1093/nar/gkab1061.

Wang Q, Navarro MV, Peng G, Molinelli E, Goh SL, Judson BL, Rajashankar KR, Sondermann H. Molecular mechanism of membrane constriction and tubulation mediated by the F-BAR protein Pacsin/Syndapin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 4;106(31):12700-5. doi: 10.1073/pnas.0902974106. Epub 2009 Jun 19. PMID: 19549836

Wang Y, Sangaré LO, Paredes-Santos TC, Saeij JPJ. *Toxoplasma* mechanisms for delivery of proteins and uptake of nutrients across the host-pathogen interface. *Annu Rev Microbiol.* 2020 Sep 8;74:567-586. doi: 10.1146/annurev-micro-011720-122318

Zimmermann L, Stephens A, Nam SZ, Rau D, Kübler J, Lozajic M, Gabler F, Söding J, Lupas AN, Alva V. A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core. *J Mol Biol.* 2018 Jul 20; 430(15):2237-2243. doi: 10.1016/j.jmb.2017.12.007. Epub 2017 Dec 16. PMID: 29258817

LEGENDS FIGURES

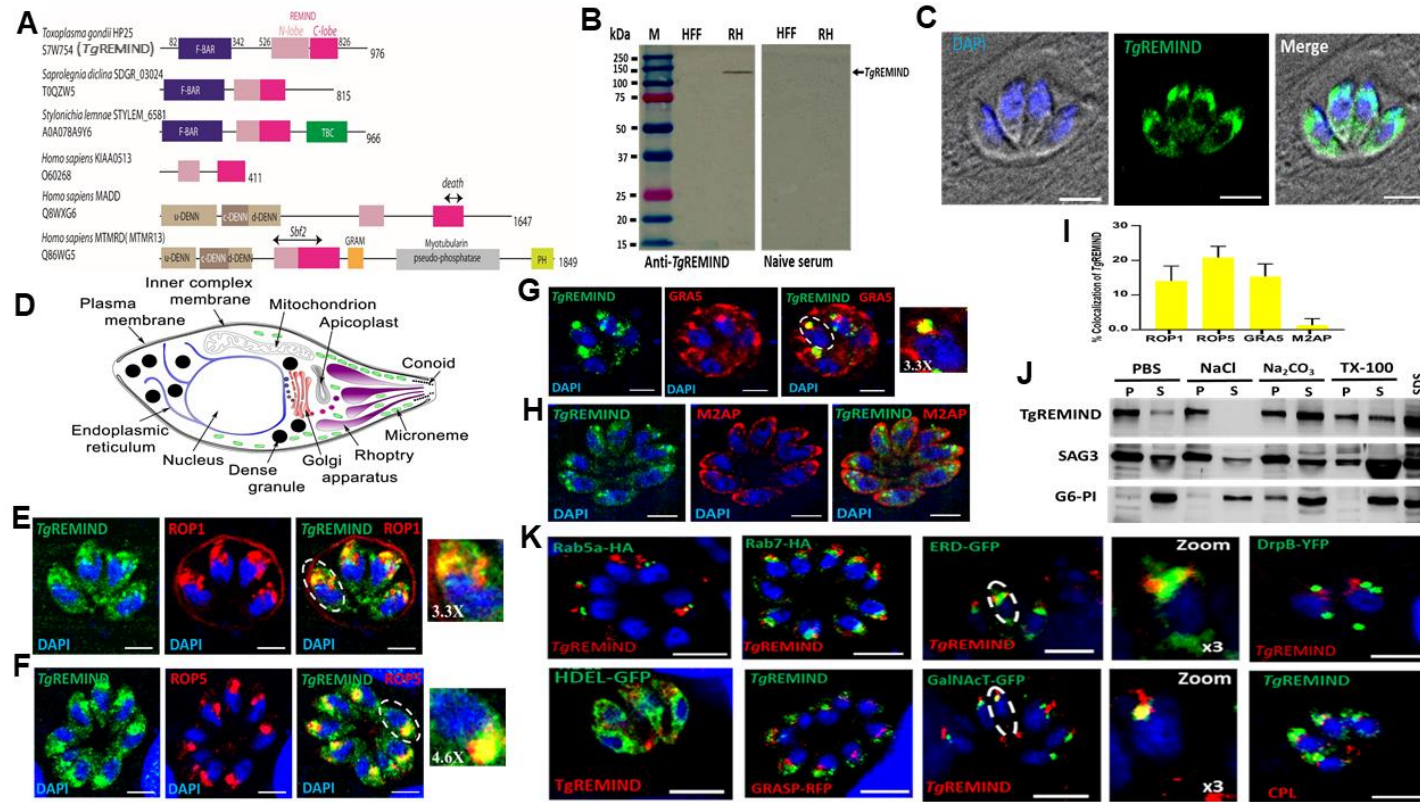


Figure 1

Figure 1. TgREMIND is a membrane-bound F-BAR-containing domain protein present in different cytoplasmic compartments
 A) Domain architecture of representative members of the REMIND family. The domain positions were extracted from the UniProt annotations. The presence of F-BAR domain at N-terminus associated with the REMIND domain at C-terminus were only present in *T. gondii* and two Oomycetes species.

B) Immunoblots probed with mouse polyclonal anti-TgREMIND antibodies reveals a single protein of about 140 kDa in *T. gondii* (RH strain) whereas no protein was detected in human foreskin fibroblast (HFF) cells. As expected, naive sera also shows no protein band.

C) Localization of TgREMIND by confocal images using the mouse polyclonal anti-TgREMIND antibodies. Scale bars, 3 μ m.

D) Schematic representation of *T. gondii* tachyzoite showing its different compartments and organelles.

E and F) Confocal image showing that TgREMIND partially colocalizes with rhoptry ROP1 and ROP5 protein. Bars, 3 μ m.

G) TgREMIND also partially colocalizes with dense granule GRA5 protein. Bar, 3 μ m.

H) TgREMIND shows no colocalization with micronem protein M2AP. Bar, 3 μ m.

I) Quantification of TgREMIND codistribution with ROP1, ROP5, GRA5 and M2AP. Bars represent n=3 independent experiments +/- standard deviation.

J) Cell fractionation on wild type *T. gondii* (RH strain) parasites. Extracellular parasites were lysed under different conditions containing chaotropic agents prepared in PBS as shown on the top of the panel. The homogenates underwent ultracentrifugation. Supernatant (S) and Pellet (P) fractions were analyzed by Western blots using antibodies specific to TgREMIND, Glycosyl-Posphatidylinositol anchored Surface Antigen 3 (GPI-SAG3) and the glycolytic enzyme, Glucose 6-Phosphate Isomerase (G6-PI).

K) Confocal images of intracellular parasites transiently transfected with plasmids expressing different compartment and organelle markers: Rab5A (early endosomal-like compartment), Rab7-HA (late endosomal-like compartment), GRASP-RFP (Golgi apparatus), ERD-GFP (Endoplasmic Reticulum/Golgi apparatus, ER/Golgi), HDEL-GFP (Endoplasmic Reticulum, ER) and GalNAcT-GFP (Trans Golgi Network, TGN), CPL (Cathepsin L-containing compartment), DrpB or dynamin B (dynamin Golgi proximal cytoplasmic inclusion) co-stained with mouse anti-TgREMIND antibodies. Bar, 3 μ m.

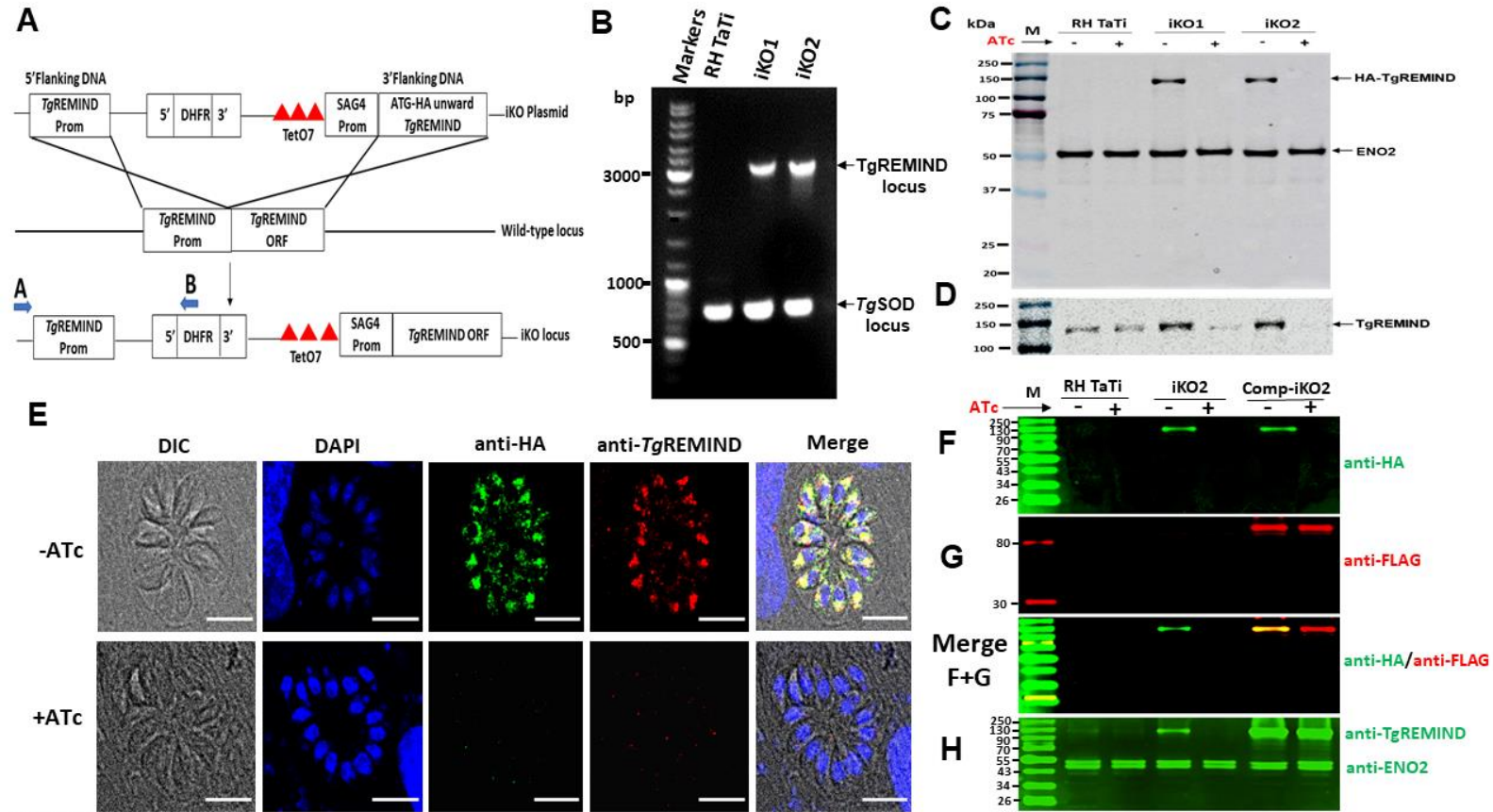


Figure 2

Figure 2. Conditional ablation of TgREMIND gene and complementation.

A) Schematic of the approach used for the conditional ablation of TgREMIND gene.

B) PCR analysis using the primers A and B (see blue arrows in panel A) confirms the conditional ablation of TgREMIND. *T. gondii* superoxide dismutase (TgSOD), positive control.

C) Immunoblots of wild type parasites and two clones (iKO1 and iKO2) of TgREMIND-deficient lines grown in the presence or absence of ATc for 48 h and probed with anti-HA antibodies. ENO2 protein was detected as a loading control.

D) Immunoblots as panel C but probed with anti-TgREMIND antibodies.

- E) Confirmation of TgREMIND conditional depletion by confocal imaging using anti-HA and anti-TgREMIND antibodies. Bar, 3 μ m.
- F) Immunoblots of ATc-untreated or treated wild type, iKO-TgREMIND and complemented Comp-iKO2 probed with anti-HA antibodies and secondary antibodies correspond to Alexa anti-rat 488 nm
- G) Immunoblots as in panel F but probed with anti-Flag antibodies and secondary antibody was Alexa anti-rabbit 568 nm
- F+G) Merged of panel F and G.
- H) Immunoblots with the loading materials as in panel A but probed with anti-TgREMIND and ENO2 (loading control) antibodies.

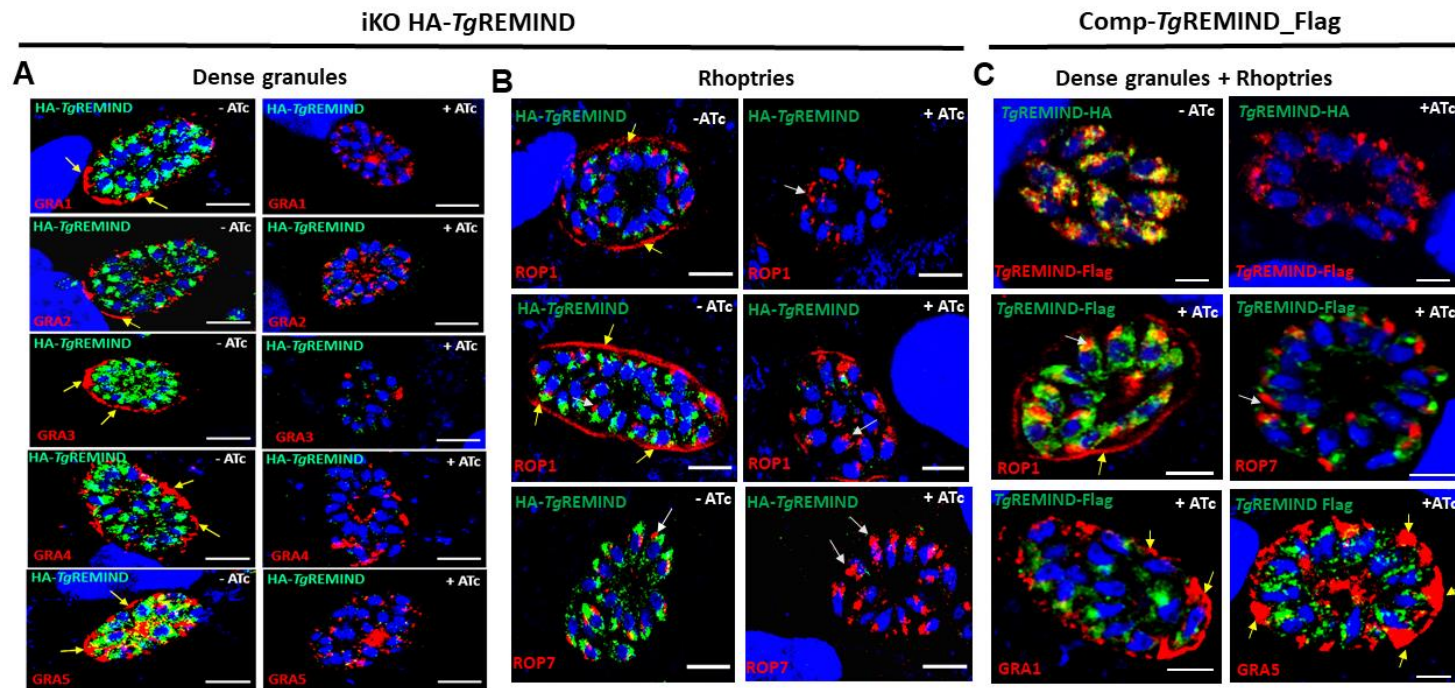


Figure 3

Figure 3. The Conditional Depletion of TgREMIND abrogates secretion of GRA and ROP proteins into the PVM

A) In the presence of ATc for 48h, the five dense granules GRA1, GRA2, GRA3, GRA4 and GRA5 proteins were all absent from the PVM of the TgREMIND-depleted mutants whereas these proteins were strongly detected by decorating the PVM (yellow arrows) of the parasitophorous vacuole, a niche in which the parasites replicate intracellularly (left panels). Bars, 3 μ m.

B) Lack of rhoptry ROP1 protein in the PVM of TgREMIND-depleted mutants treated by ATc for 48h (top and middle left panels) while in the ATc-untreated TgREMIND mutants, the protein displays typical strong signal staining the PVM (top and middle right panels, yellow arrows). Under the same conditions, the rhoptry ROP7 protein, which is not normally secreted in the PVM appears as punctated and fragmented signal (bottom left signal, white arrows) compared to ATc-untreated mutants (bottom right panel).

C) Complementation of iKO-TgREMIND-deficient mutants with ectopic full length TgREMIND protein tagged to epitope Flag (Comp-TgREMIND-Flag) restored the normal decoration of ROP1 (middle left panel) and compacted apical signal of ROP7 in the presence of ATc, in a manner similar to wild type parasites. The complementation also rescued the PVM staining of GRA1 and GRA5 protein under pressure of ATc (bottom panels). Top panels correspond to the colocalization of TgREMIND-HA and Comp-TgREMIND_Flag demonstrating that both endogenous TgREMIND and the complemented protein are located in the same subcellular compartments (top left panel) and in the presence of ATc, TgREMIND-HA was depleted from the conditional mutants as expected (top right panel).

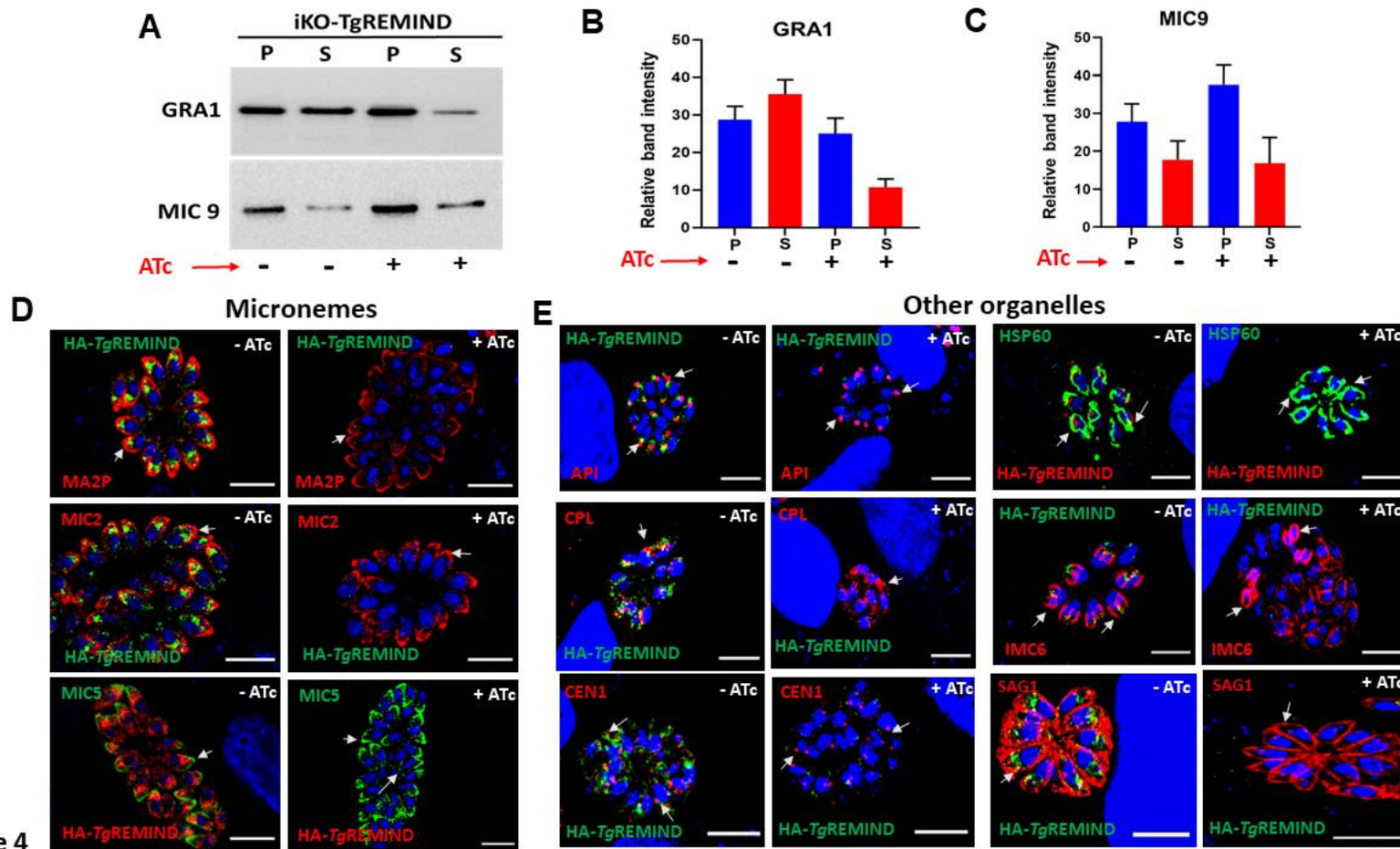


Figure 4

Figure 4. Phenotypic analysis of other organelles in TgREMIND-depleted parasites

A) Illustration of one representative of immunoblot showing GRA1 (top panel) and MIC9 (bottom panel) secretion of ATc-untreated *versus* treated TgREMIND-deficient parasites.

B) Quantification of GRA1 and MIC9 secretion from ATc-untreated and treated TgREMIND-deficient parasites. Bars represent n=3 independent experiments +/- standard deviation.

D) TgREMIND depleted parasites show classical and normal pattern of micronemes as demonstrated by confocal images of three distinct anti-MIC (M2AP, MIC2 and MIC5) antibodies, regardless of ATc treatment (right panels) or not (left panels). Bars, 3 μ m.

E) Subcellular localizations of the apicoplast (Atrx2, Api), mitochondrion (HSP60), cathepsin L-containing compartment (CPL), inner complex membrane (IMC), centriole (CEN1) and plasma membrane (SAG1) markers were unchanged in the TgREMIND-deficient mutant. These data indicate that TgREMIND regulates dense granule and rhoptry biogenesis but it has no impact on microneme functions. Bars, 3 μ m

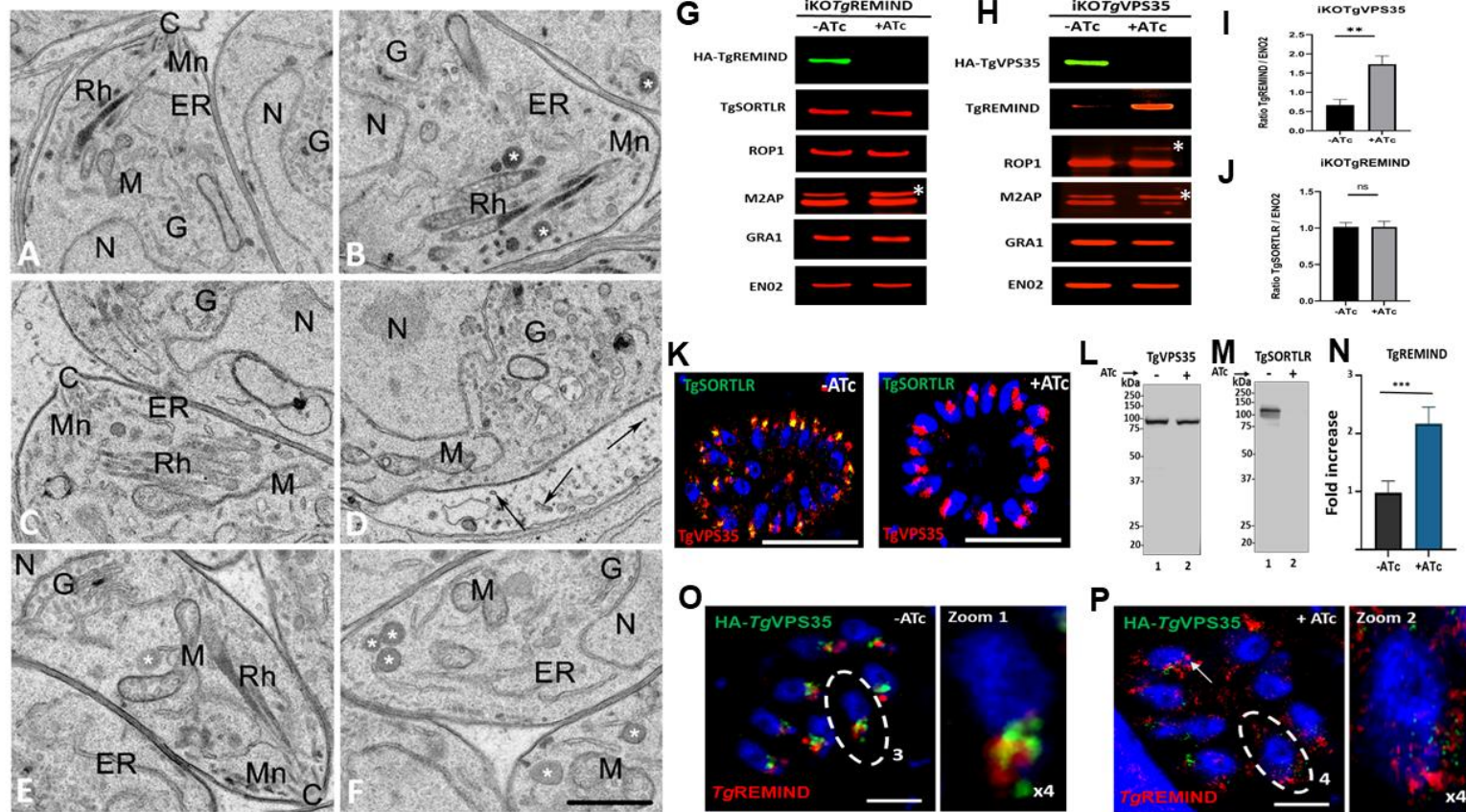


Figure 5

Figure 5. TgREMIND is crucial for biogenesis and functions of dense granules and rhoptries

A and B) Transmission electron micrograph showing typical crescent shape and opaque rhoptries (Rh), dense granules (white stars), micronemes (Mn) in the ATc-untreated TgREMIND-deficient mutants.

C and D) Ultrathin sections of TgREMIND-deficient mutants lacking dense granules and showing translucent rhoptries after 48 hr of ATc treatment.

E and F) Complementation of TgREMIND-deficient mutants restored the presence of dense granules (white stars) and normal morphology of rhoptries (Rh). C, conoid; ER, endoplasmic reticulum, G, Golgi apparatus, M, mitochondrion and N, nucleus. Bar 500 nm

G) Immunoblots showing that conditional disruption of TgREMIND gene showed no changes in TgSORT, ROP, GRA and MIC protein levels in ATc-treated or not of TgREMIND mutants. No changes were also observed in ROP and MIC processing and maturation.

H) Conditional disruption of TgVps35 gene led to an important accumulation of TgREMIND protein level. Inhibition of ROP and MIC processing and maturation was confirmed in TgVps35-deficient parasites.

I) Quantification showing a 3-fold increase of TgREMIND level in TgVps35-deficient parasites. Bars represent n=3 independent experiments +/- standard deviation.

J) Quantification of TgSORT level was unchanged in TgREMIND-deficient mutants regardless of ATc treatment or not. Bars represent n=3 independent experiments +/- standard deviation.

K) Confocal images showing the expression of HA-TgVps35 after gene knock-in into TgSORT-deficient mutants after double homologous recombination in the UPRT locus. IFA were performed using anti-HA and anti-TgSORT antibodies. Bars, 3 μ m.

L) Immunoblots demonstrating expression of HA-TgVps35 protein was unchanged after ATc treatment or not, as expected.

M) Immunoblots confirming that background of iKO-TgSORT was used as ATc-treatment led to disappearance of TgSORT protein.

N) Quantification of TgREMIND protein level in the knock-in of HA-TgVps35/iKO-TgSORT after coimmunoprecipitation and semi-quantitative mass spectrometry. These data confirmed the increase of more than 2-fold of TgREMIND level in TgVps35-depletion mutants.

O) Localization of TgREMIND protein in ATc-untreated TgVps35-deficient mutants using anti-HA and anti-TgREMIND antibodies. Zoom shows the vicinity and partial codistribution between TgREMIND and TgVps35 proteins. Bars, 3 μ m.

P) Localization of TgREMIND protein in ATc-treated TgVps35-deficient mutants showing perturbation of TgREMIND distribution with the absence of the intense aggregate fluorescence on the apical end of the parasites. Bars, 3 μ m.

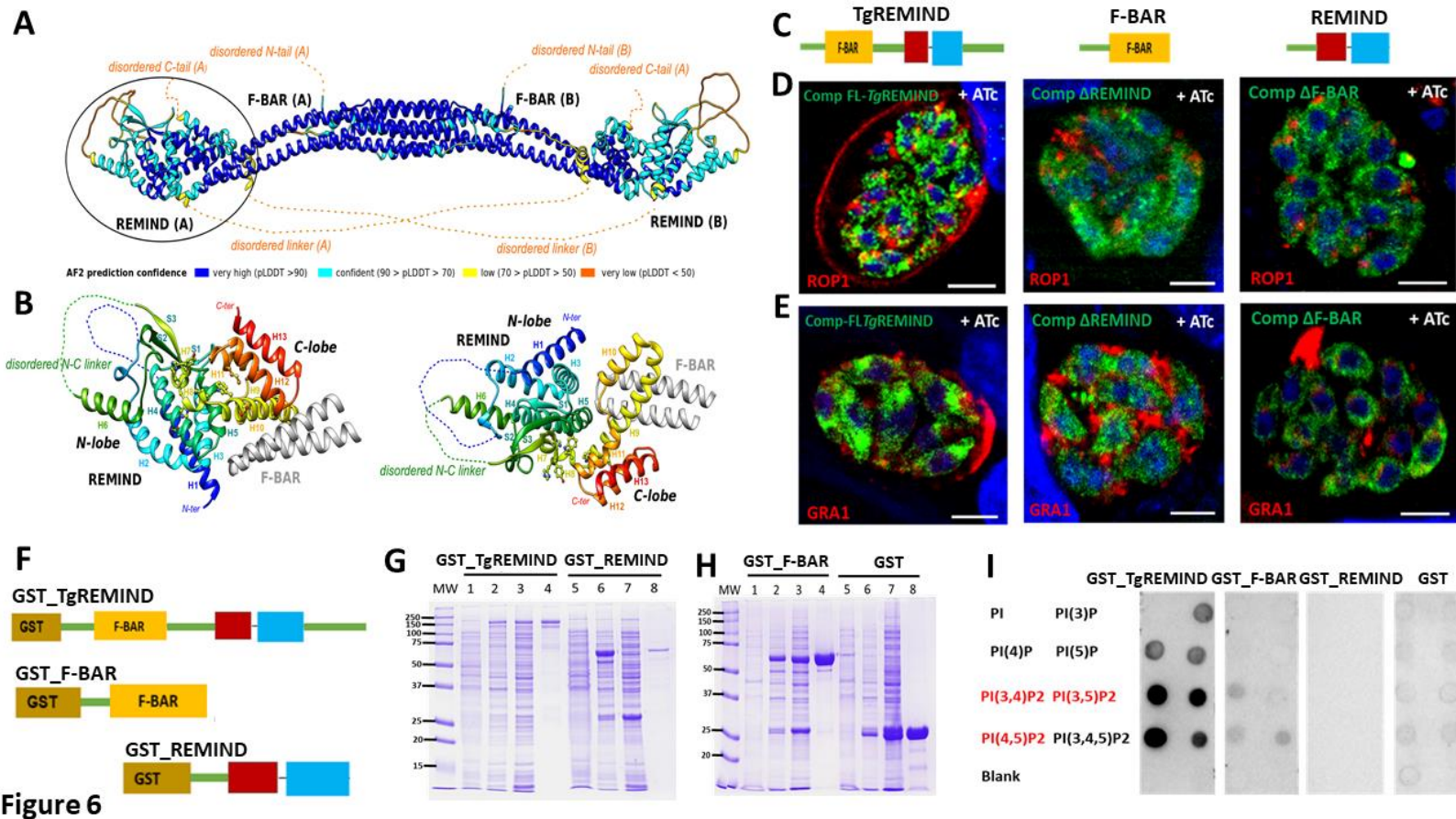


Figure 6

Figure 6. TgREMIND is a genuine F-BAR containing protein that requires its C-terminus REMIND domain for efficient binding to PI2P lipids

A) AlphaFold2 model of the 3D structure of Tg REMIND showing a dimer, which is per residue coloured according to the pLDDT. The disordered segments, associated with very low pLDDT values, are represented with orange, dashed lines. The dimer of F-BAR domains was modelled based on the superimposition of the AF2 model with the biological assembly of the human formin-binding protein 1 (pdb 2EFL).

- B) Focus on the REMIND domain (left, in the same orientation than in panel A (encircled domain) and right, with a 90° rotation), colored from blue (N-terminus) to red (C-terminus).
- C) Schematic representation of plasmids expressing FLTgREMIND-Flag, F-BAR-Flag and REMIND-Flag proteins used for transient transfection.
- D) Confocal images showing that the N-terminus F-BAR domain alone or the C-terminus REMIND domain cannot restore the presence of ROP1 in the PVM of intracellularTgREMIND-deficient mutants under ATc treatment (middle and right panels). Only complementation with the full length TgREMIND protein restores secretion ROP1 in the PVM in TgREMIND-deficient parasites under ATc pressure (left panel). Bars, 3 μm.
- E) Confocal images showing that the N-terminus F-BAR domain alone or the C-terminus REMIND domain cannot restore the presence of GRA1 in the PVM of intracellularTgREMIND-deficient mutants under ATc treatment (middle and right panels). Only complementation with the full length TgREMIND protein restores secretion GRA1 in the PVM in TgREMIND-deficient parasites under ATc pressure (left panel). Bars, 3 μm.
- F) Schematic representation of plasmids used to express recombinant GST_TgREMIND, GST_F-BAR and GST_REMIND proteins in *Escherichia coli*.
- G and H) SDS-PAGE and coomassie blue staining of expression and purification of recombinant of GST_TgREMIND, GST_F-BAR and GST_REMIND. 1, uninduced transformed bacteria; 2, IPTG-induced recombinant bacteria; 3, total extract protein after sonication; 4) GST-affinity purification.
- I) Lipid overlay experiments using the purified recombinant proteins described in panel G and H using different PIP2 lipid species.

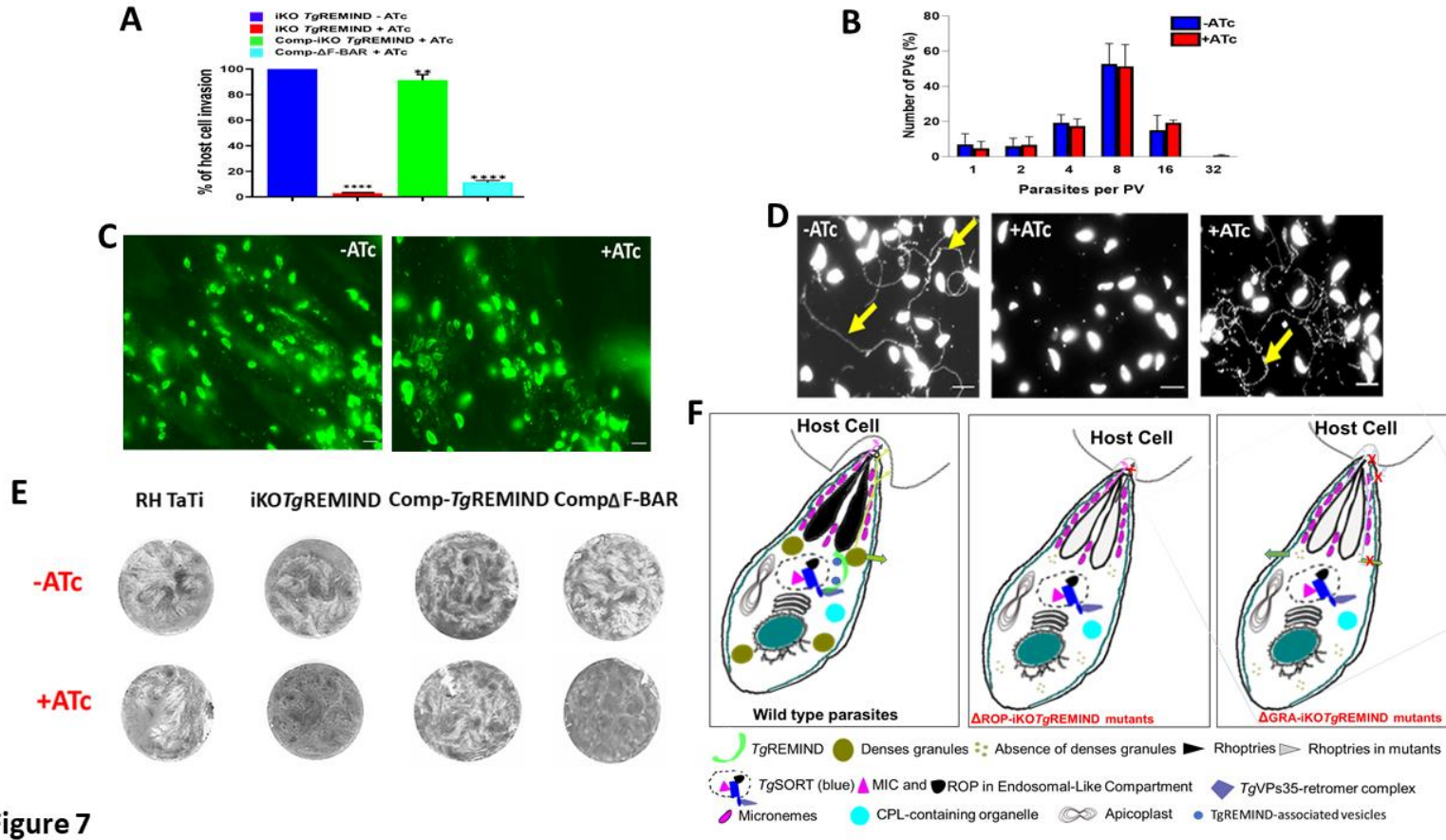


Figure 7

Figure 7. *TgREMIND* is Essential for Gliding Motility, Host Cell infection and Dissemination

A) Host cell invasion was severely impaired in *TgREMIND*- deficient mutants after ATc treatment for 48 hr. Complementation with the full length *TgREMIND* protein restored this phenotypic trait whereas complementation with the C-terminus domain alone cannot significantly restored host cell invasion. Bars represent n=3 independent experiments +/- standard deviation.

B) The rate of multiplication of *TgREMIND*-deficient mutants grow and replicate is identical in HFF cells, regardless of ATc treatment or not, thus demonstrating that the lower level of host cell invasion is not a consequence of reduced rate of parasite division. Bars represent n=3 independent experiments +/- standard deviation.

- C) Ca²⁺ ionophore induced egress is normal for TgREMIND-deficient mutants under ATC pressure or not.
- D) Gliding motility defined by trail deposition (white arrows) was impaired in the conditional iKO-TgREMIND mutants (middle panel), complementation with full length TgREMIND rescued gliding motility. As expected, iKO-TgREMIND motility was normal in the absence of ATc (, left panel, white arrows).
- E) The conditional TgREMIND depletion dramatically prevents the lytic, invasion cycles and dissemination, thus affecting plaque formation in the presence of ATc for 7 days (iKOTgREMIND versus parental RH TaTi). Complementation with full length TgREMIND (Comp-TgREMIND) restored plaque formation while complementation with REMIND alone was unable to efficiently rescue plaque formation.
- F) Model of TgREMIND functions in biogenesis and secretion of dense granules and rhoptries of *T. gondii*.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Legend Figure

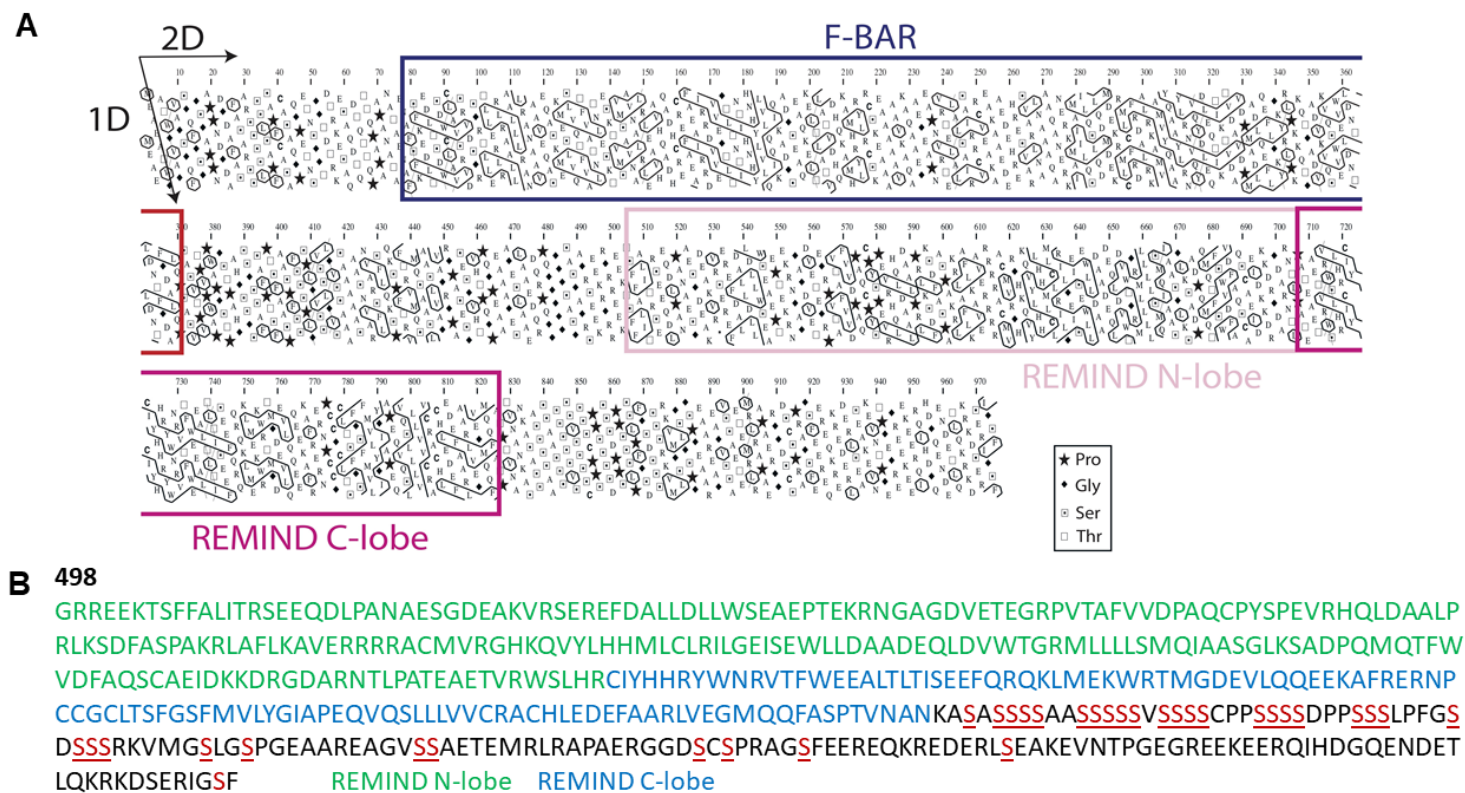


Figure S1

976

Figure S1. Hydrophobic Cluster Analysis (HCA) plot of the amino acid sequence of TgREMIND (TgHP25).

A) The sequence is shown on an alpha-helical net, in which strong hydrophobic amino acids (V, I, L, F, M, Y, W) are contoured (Callebaut et al., 1997). They form hydrophobic clusters, which mainly corresponds to regular secondary structures. Regions with high density in hydrophobic clusters constitute foldable domains (Faure and Callebaut 2013). Two foldable domains (boxed) are

present in the TgREMIND sequence, corresponding to the F-BAR domain (blue) and to the REMIND domain (pink). The way to read the sequence (1D) and the regular secondary structures (2D) is indicated with arrows. Special symbols are reported in the inset. B) Amino acid sequences the C-tail of TgREMIND with a stretch of 3-5 contiguous serine amino acid. Amino acids in blue correspond to REMIND C-lobe and in green, the REMIND N-lobe.

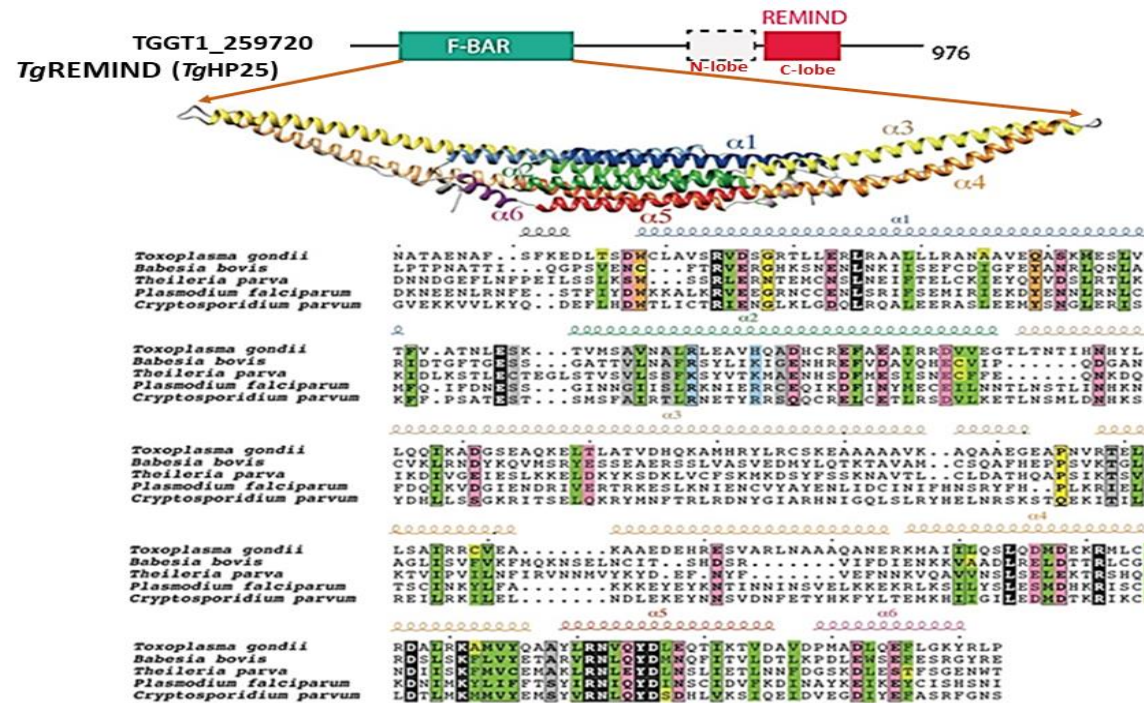


Figure S2

Figure S2. Sequence alignment of TgREMIND F-BAR domains from several *Apicomplexa*, and relationship to the 3D structure.

Positions in which high sequence conservation is observed are boxed and coloured green for hydrophobic amino acids, orange for aromatic ones, blue and pink for basic and ones, grey for small ones and yellow for loop forming amino acids. Correspondence to the secondary structures, as observed on the experimental 3D structure of the formin-binding protein 17 EFC/F-BAR domain (pdb

2efl) (PHYRE2 results, Kelly et al. 2015), shown on top, is indicated above the alignment. The UniProt identifier, total number of amino acids of the protein and the start and end positions of the alignment are given after the protein names: *Toxoplasma gondii* TGGT1_259720 (S7W754, 976 aa) aa 72-344, *Babesia bovis* BBOV_III009360 (A7APK8, 588 aa) aa 78-339, *Theileria parva* TP04_0845 (Q4N1A1, 584 aa) aa 72-339, *Plasmodium falciparum* PFMC_03105 (A0A024X5W8, 1157 aa) aa 20-292, *Cryptosporidium parvum* cgd5_2090 (Q5CRN7, 681 aa) aa 11-285.

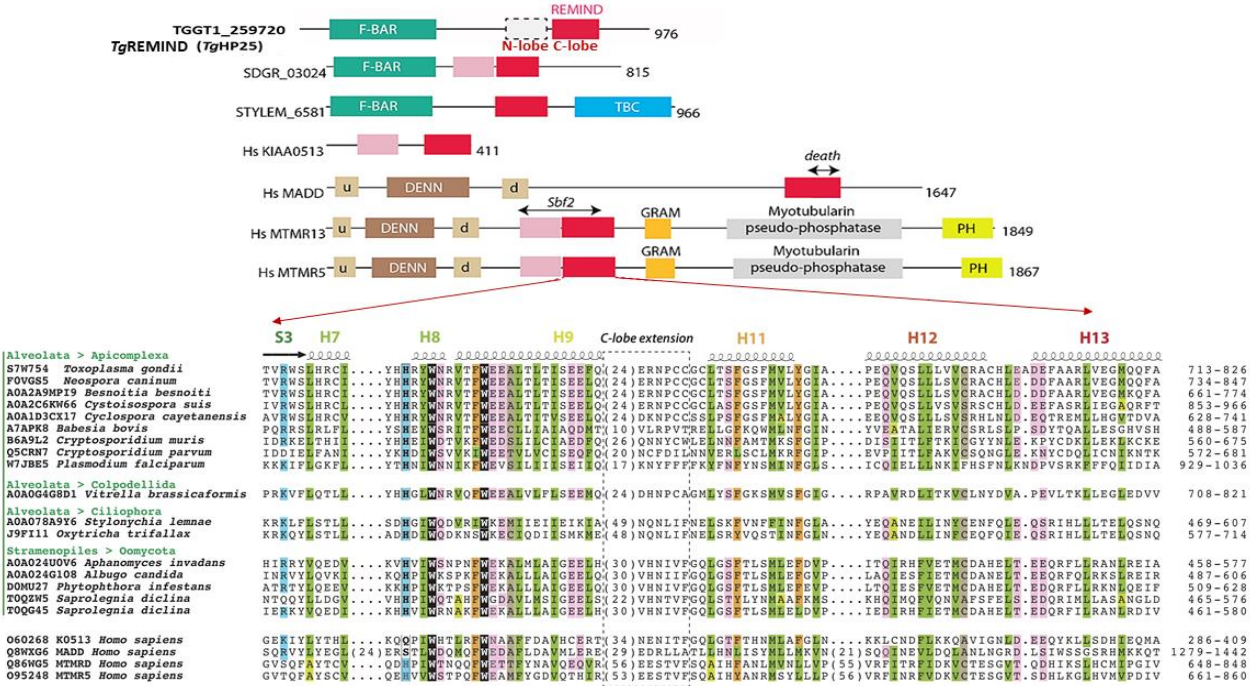


Figure S3

Figure S3. Alignment of the REMIND C-terminal lobe sequences from representative members of the family.

The regular secondary structures as predicted in the AF2 model of TgREMIND are reported above the alignment. The most conserved positions are coloured (green : strong hydrophobic amino acids (V, I, L, M, F, Y, W); light green : non strong hydrophobic amino acids (A); orange : aromatic amino acids (F, Y, W), blue : basic amino acids (R, K, H); red : E, D, Q, N, S, T; brown : small amino acids (A, T, S, C, M)). The central dashed box highlights the position of the C-lobe extension, including helices of variable lengths and sequences (helix H10 in the AF2 model of Tg HP25). Sequences are designated with their UniProt accession numbers.

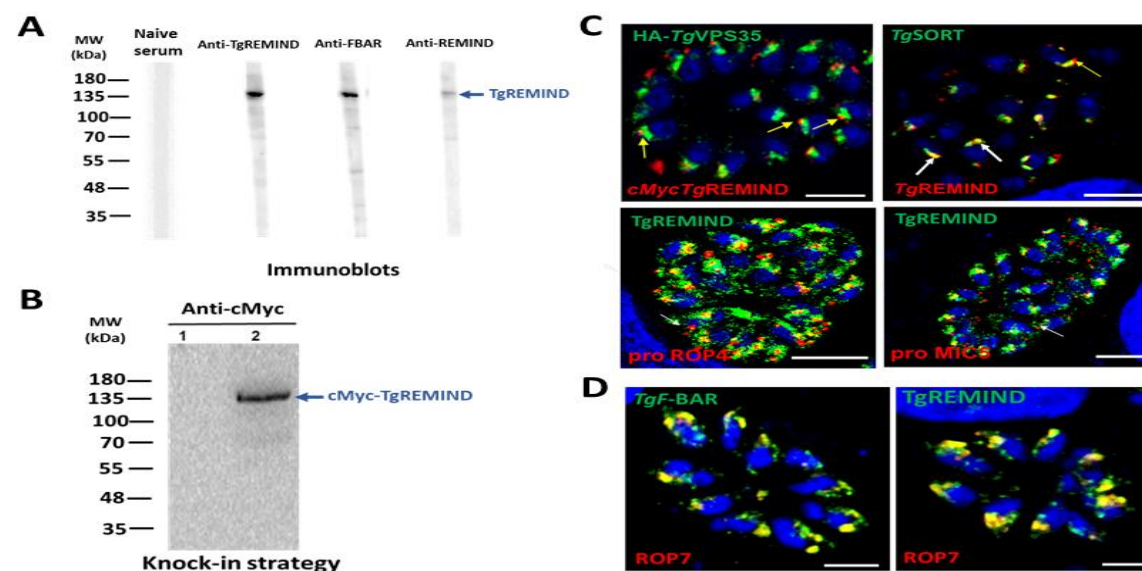


Figure S4

Figure S4. TgREMIND migrates as 140-kDa protein and localizes in the cytoplasm of *T. gondii*

A) Immunoblots of total extract protein from *T. gondii* RH strain, which was revealed with mouse polyclonal antibodies raised against GST recombinant full length TgREMIND, anti F-BAR and anti-REMIND. All three polyclonal antibodies recognized a single protein of 140 kDa while the naïve mouse stained no protein band, as expected.

A) Immunoblots of total extract protein from transgenic knock-in of c-MycTgREMIND parasites, which was stained with anti-cMyc antibodies. Again, only a single band of 140 kDa was detected.

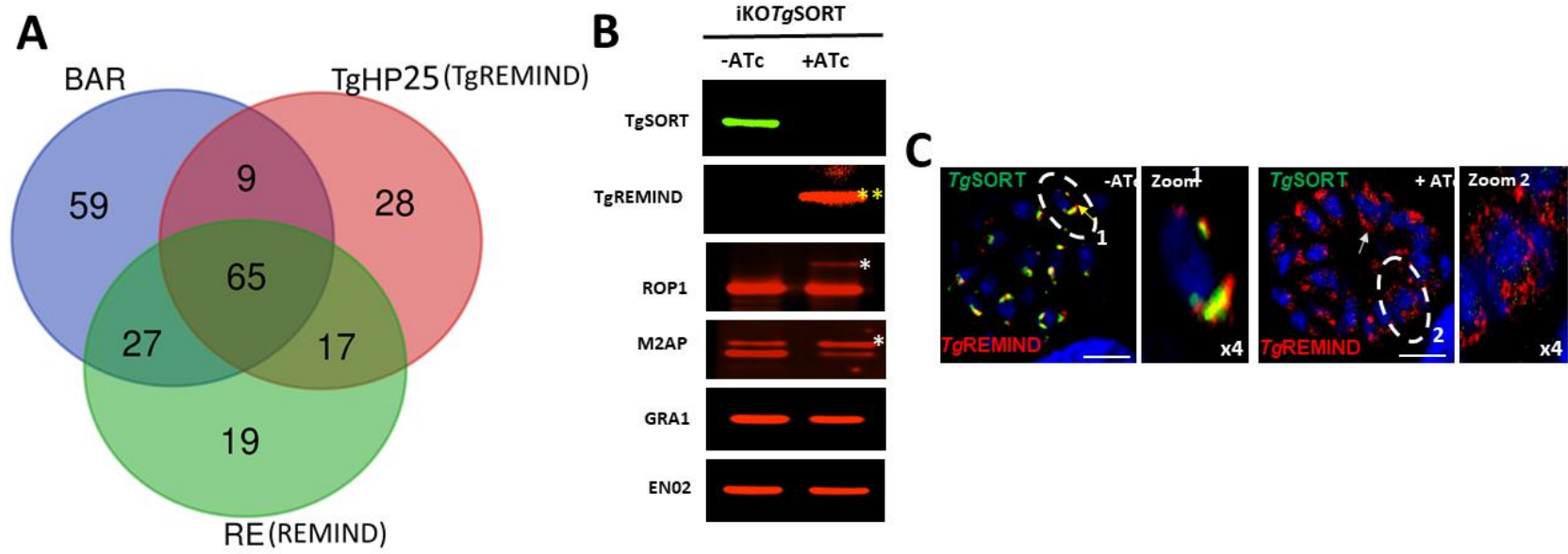


Figure S5

Figure S5. Proteomics analyses and expression of TgREMIND in iKOTgSORT mutants

A) Venn diagram showing proteins pulled down by GST-BAR, GST-REMIND and GST-TgREMIND and identified by LC/MS-MS.
 B) Confocal showing expression TgREMIND protein in ATc-untreated or treated TgSORT-deficient parasites.
 C) Conditional disruption of TgSORT gene led to an important accumulation of TgREMIND protein level. Inhibition of ROP and MIC processing and maturation was confirmed in the TgSORT-depleted parasites.

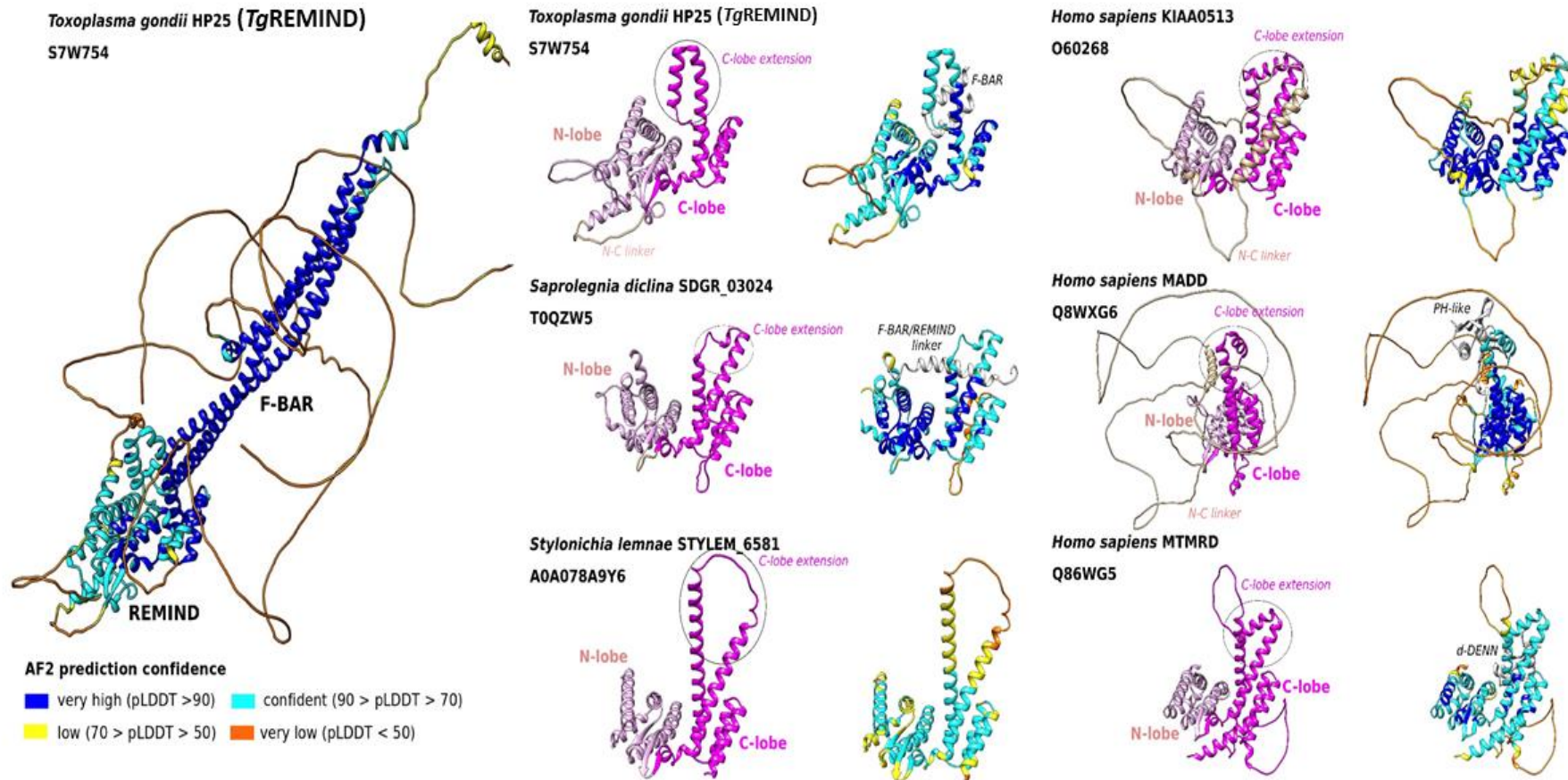
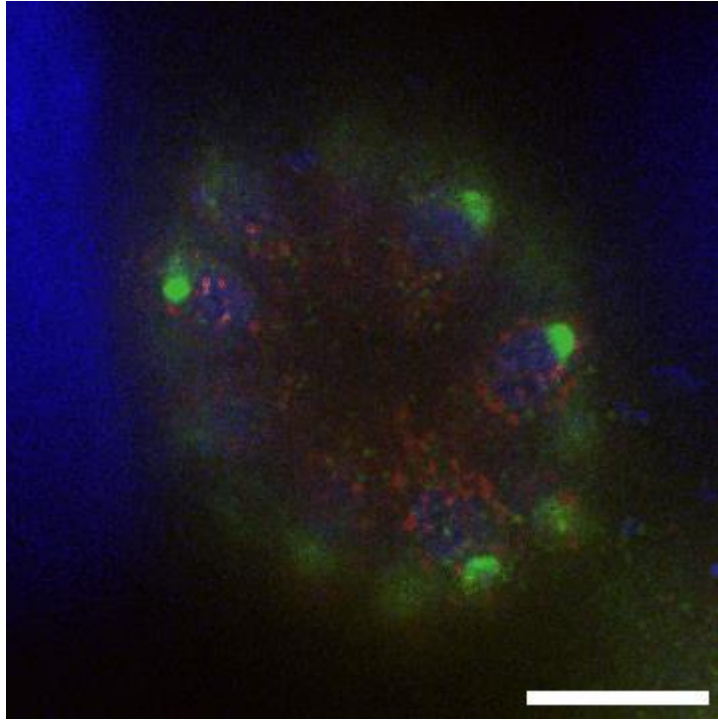


Figure S6

Figure S6. AlphaFold2 models of the 3D structures of the REMIND domain from representative members of the family. The model of the full-length 3D structure of TgREMIND is shown at left, coloured per residue according to the pLDDT values. At right are shown the models of the REMIND 3D structures, coloured according to the N- and C-lobe positions (left views) and to the pLDDT scores (right views). Regions of the proteins interacting with the C-lobe extensions are highlighted with grey ribbons.



Video S1: Signals of TgSORT (in green) partially intersected those of TgREMIND (red)

Supplemental Experimental Procedures

SDS-PAGE for Mass Spectrometry Analyses

Sixteen (16) μl of supernatant were mixed with 4 μl of 5X Laemmli buffer and heated at 100°C for five minutes. SDS-PAGE was performed in 12% polyacrylamide gel under reducing conditions at 30 V for stacking then at 70 V and 120 V for separation. Gels were then stained with BIO-RAD Coomassie brilliant blue R-250. The protein bands of interest were excised and processed for mass spectrometry analysis as described below.

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

Gel bands corresponding to each eluate from the pull down using GST-TgREMIND, GST-F-Bar and GST-REMIND were washed three times with 120 μl solution of 25 mM ammonium bicarbonate (NH_5CO_3)/acetonitrile (50/50, v/v) for 10 min. In-gel reduction and alkylation of protein disulfide bonds was performed with 100 μl of 10 mM of DTT in 50 min at 57 °C and 100 μl of 50 mM of iodoacetamide (IAM) respectively for 30 min at room temperature. After a washing step with 120 μl of 25 mM NH_5CO_3 and the dehydration step with 100 μl acetonitrile for 5 min, an in-gel digestion was performed on each sample with 0.07 μg 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_5CO_3 (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 μl of water containing 0.1% formic acid. Aliquots of 3 μl 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 μm inner diameter, C18, 2 μm , 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 followed by a washing step for 5 min with 70% solvent B and an equilibration step for 11 min with 2% solvent B. 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 1×10^6 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 in the Orbitrap mass analyzer with resolution of 35,000 at m/z 200 and an automatic gain control of 2×10^5 . The ion intensity selection threshold was 6.7×10^4 , 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. 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.

References

Callebaut I, Labesse G, Durand P, Poupon A, Canard L, Chomilier J, Henrissat B, Mornon JP. Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cell Mol Life Sci.* 1997 Aug;53(8):621-45. doi: 10.1007/s000180050082

Faure G, Callebaut I. Comprehensive repertoire of foldable regions within whole genomes. *PLoS Comput Biol.* 2013 Oct;9(10):e1003280. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003280.

II Caractéristiques de START domain containing protein (*TgSTART*) un des transporteurs de lipide chez *T. gondii*

II-1 Analyse de la séquence de *TgSTART*

Le gène TGGT1_223150 code pour la protéine prédite *TgSTART* : START domain containing proteine chez *T. gondii*, une protéine composée de 424 acides aminés prédictifs (ToxoDB). Les analyses bio-informatiques sont effectuées dans HHpred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>) (Zimmermann et al., 2018) à partir de la séquence d'acide aminé de *TgSTART*. Ces analyses nous ont révélé que le domaine N-terminal de la protéine *TgSTART* est composé de 142 acides aminés (1-143 AA) et le domaine C-terminal : START renferme 234 AA (190-424 AA) (Figure 18 A). Les deux domaines prédictifs sont liés par une petite séquence de 47 AA (Figure 18 A). Le domaine N-terminal code pour Retinol-Binding Protein (RBP) (HHpred) qui lie le retinol à partir d'une petite cavité (en rouge) située dans la structure prédictive, alors que le domaine START code pour StAR-related lipid transfer protein (HHpred) qui de part une grande cavité (en rouge) logée dans la structure prédictive fixe les lipides (Figure 18 B). Les structures prédictives ont été obtenues par modélisation dans AlphaFold par Dr. Sophie ZINN-JUSTIN.

Pour identifier les homologues de *TgSTART* (TGGT1_223150) présentes chez *T. gondii*, nous avons adopté l'algorithme du blast (Altschul et al. 1997). Nous avons recherché la séquence protéique de *TgSTART* (TGGT1_223150) dans ToxoDB. A l'issue de cela, deux homologues de *TgSTART* ont été identifiés chez *T. gondii*, il s'agit des gènes TGGT1_231000 (857 AA) et TGGT1_236660 (1424 AA) dont les tailles prédictives sont respectivement deux et trois fois supérieures à celle prédictive de *TgSTART* (TGGT1_223150).

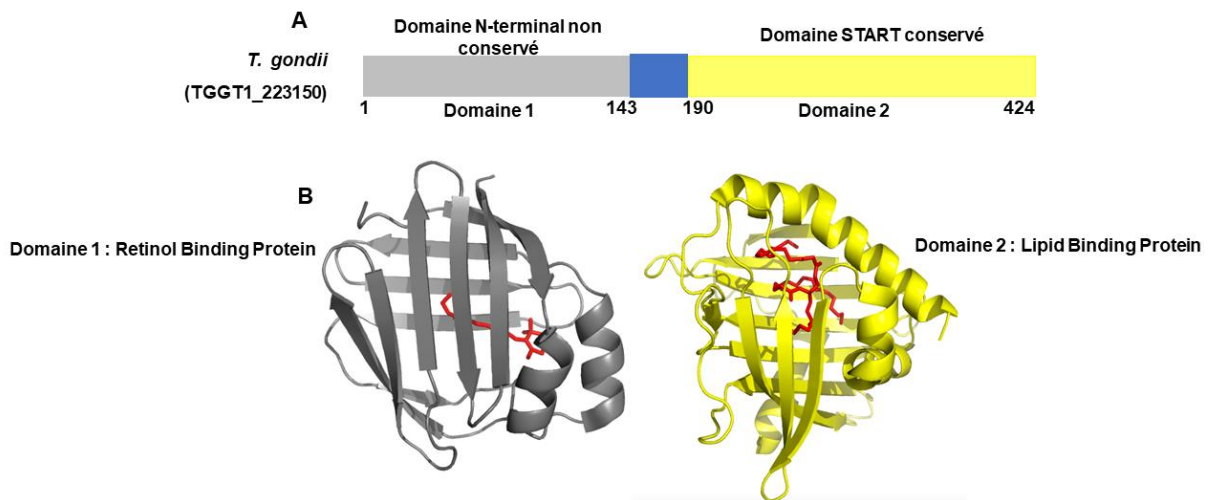


Figure 18 : Différents domaines et structures prédictives de *TgSTART*

A : les domaines prédictifs de *TgSTART*, **B** : les structures prédictives des deux domaines de *TgSTART*

II-2 Expression de *TgSTART* chez les parasites transgéniques de *T. gondii*

L'immunofluorescence réalisée par microscopie confocale sur les parasites transgéniques knock-in de *TgSTART* en utilisant l'anticorps anti HA a révélé que la protéine *TgSTART* se présente sous forme de petites vésicules très brillantes (Figure 19). Ces vésicules sont présentes un peu partout dans le cytoplasme des parasites, laissant ainsi présumer que *TgSTART* fixe ou décharge les lipides qu'elle transporte au niveau de différents compartiments subcellulaires. L'expression de *TgSTART* dans les parasites transgéniques est confirmée par western blot réalisé sur des parasites transgéniques extracellulaires de *TgSTART* purifiés en utilisant l'anticorps anti HA du rat. A cet effet, nous avons constaté que la taille de *TgSTART* obtenue est d'environ 250 kDa (Figure 20) ce qui est environ 6 fois supérieure à la taille prédictive qui est de 42,4 kDa (Toxodb). L'iKO-HA-*TgREMIND* a été utilisée comme contrôle positif et les contrôles négatifs dans lesquels nous n'avons observé aucune bande dans les extraits protéiques totaux de la souche RH-TaTi et de cellules HFF non-infectées. Tout cela nous a permis de conclure dans un premier temps que la bande située à environ 250 kDa est spécifique exprimée dans les parasites transgéniques, obtenus par la stratégie « knock-in » pourrait correspondre à *TgSTART* chez *T. gondii*.

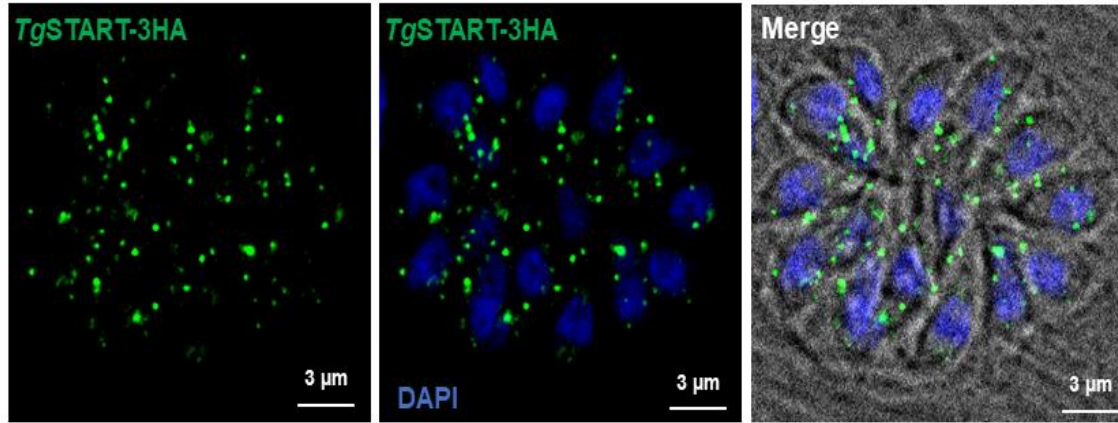


Figure 19 : Localisation subcellulaire de *TgSTART* tagguée HA3x chez les parasites transgéniques

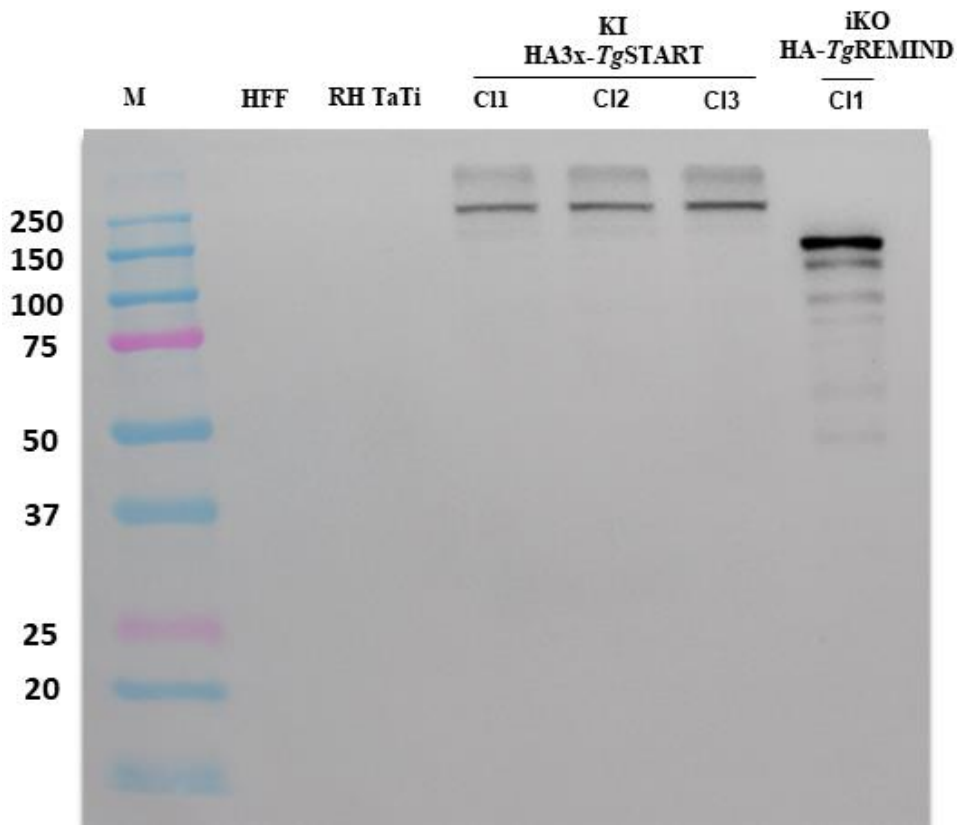


Figure 20 : Western blot du lysat protéique total des parasites transgéniques de *TgSTART*-HA3x avec l'anticorps anti HA

II-3 Distribution de *TgSTART*-HA3x par rapport aux organites et compartiments connus chez *T. gondii*

Pour vérifier la distribution de *TgSTART*-HA3x par rapport aux différents organites et compartiments toxoplasmiques connus, nous avons effectué une double immunofluorescence

(IF) sur les parasites transgéniques exprimant la protéine *TgSTART*-HA3x, en utilisant les marqueurs spécifiques des différents compartiments et organites et l'anticorps anti HA. En effet, la distribution de *TgSTART*-HA3x est traduite par la colocalisation entre les protéines de ces compartiments et organites toxoplasmiques et la protéine *TgSTART*-HA3x. Ainsi, à l'issue de l'IF, nous avons constaté que malgré la présence de *TgSTART*-HA3x un peu partout dans le parasite, aucune des vésicules ne colocalise ni avec les marqueurs des rhoptries : ROP1 et ROP5 (Figure 21 a et b) ni avec le marqueur des micronèmes MA2P (Figure 21 c), ce qui nous laisse présumer que *TgSTART*-HA3x ne se situe pas au niveau de ces organites. Toutefois, nous ne pouvons exclure un contact temporaire et instable, ce qui fait que nous ne pouvons l'observer avec une technique d'immunofluorescence qui fixe à un instant précis les parasites intracellulaires. De même, elle ne colocalise non plus avec les marqueurs de l'ELC (*Endosome-Like-Compartment*) tels que Pro-ROP4 (Figure 20 d) et Pro-MA2P (Figure 21 e) qui sont les pro-protéines produites avant la maturation respective des rhoptries et des micronèmes. La protéine *TgSTART*-HA3x ne se situe non plus au niveau du complexe membranaire interne (IMC) (Figure 21 g). Par contre, nous avons constaté que certaines vésicules de *TgSTART*-HA3x touchent quelques rares fois les protéines GRA1 et SAG1 qui sont respectivement les marqueurs des granules denses et de la surface de *Toxoplasma gondii*. Ces contacts avec les GRA sont peut-être aléatoires et dus au fait que les granules denses sont également distribués aléatoirement dans le cytoplasme du parasite comme *TgSTART*. En revanche, des contacts avec un marqueur de la membrane plasmique pourraient suggérer un lieu d'échange entre les lipides transportés par *TgSTART*. En conclusion, toutes ces observations ne nous ont pas permis de préciser avec certitude pour l'instant, le lieu de fixation et de décharge du type de lipide fixé par *TgSTART*.

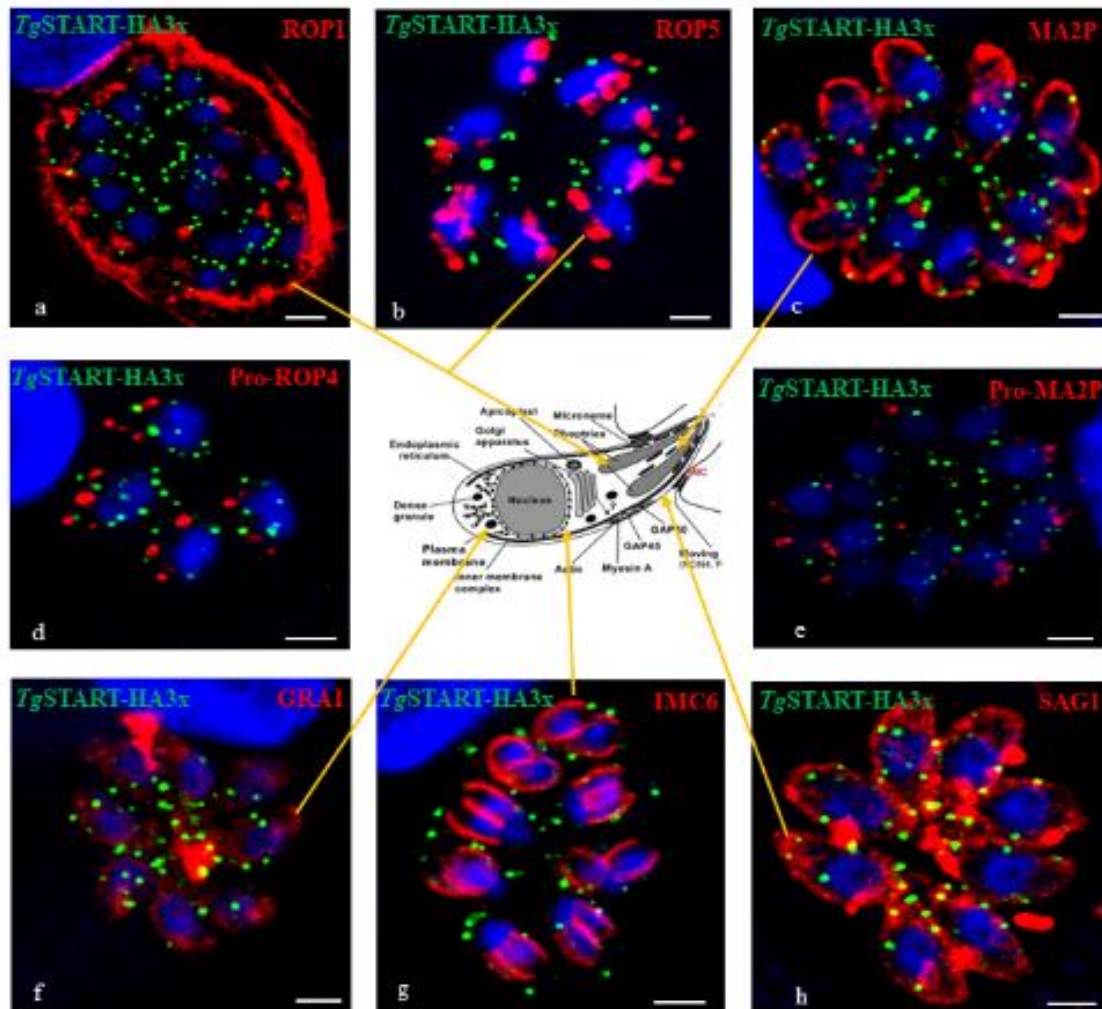


Figure 21 : Distribution de *TgSTART-HA3x* chez *Toxoplasma gondii*

II-4 Expression de *TgSTART* chez les parasites mutants Knockdown inductibles

Nous avons essayé plusieurs fois sans succès d'obtenir le mutant iKO-*TgSTART* par la technique de Knock-Out inductible comme nous l'avons fait pour le gène de *TgREMIND* chez *T. gondii*. Cela pourrait être lié au séquençage partiel du gène de *TgSTART* puisque la séquence maximale du promoteur du gène *TgSTART* est de 604pb <https://toxodb.org/cgi-bin/geneSrt>, ce que nous avons utilisé pour le clonage donc inférieure à 1000pb cela n'a pas pu favoriser une recombinaison homologue. C'est ainsi que nous avons essayé d'obtenir le mutant Knockdown inductible de *TgSTART* grâce à la technique du système Auxine Dégron Inductible (AID) (Brown et al., 2018). En effet, deux clones ont été obtenus après criblage et l'intégration du plasmide dans le locus des parasites a été vérifiée à partir des amorces (voir Tableau III) par les deux PCR1 et PRC2 (Figure 22 A). A partir de la PCR1 une bande de 800pb qui représente le locus des parasites sauvages a été amplifiée, ce qui était négative pour les deux clones de *TgSTART-3HA-AID*. A l'opposé de la PCR1, la PCR2 a révélé une bande de 400pb

uniquement dans les deux clones représentant ainsi le locus des parasites mutants (Figure 22 A). La disparition totale de la protéine *TgSTART* après le traitement des parasites avec 500 μ M de l'IAA pendant une durée de 28h, a confirmé l'obtention du mutant *TgSTART* (Figure 22 C). L'expression de *TgSTART* dans les parasites mutants après l'IF réalisée en utilisant l'anticorps anti HA, a confirmé le signal de *TgSTART* qui se traduit par les mêmes vésicules très intenses et leur localisation cytoplasmique précédemment observés dans les parasites transgéniques de *TgSTART*. De même le Western blot effectué sur les parasites mutants de *TgSTART* a également confirmé non seulement l'expression de *TgSTART*, mais aussi la taille d'environ 250 kDa de la protéine *TgSTART* (Figure 22 B) précédemment obtenue aussi à partir des parasites transgéniques. Pour avoir plus de certitude sur la taille de 250 kDa, nous avons essayé d'exprimer la protéine *TgSTART* dans la bactérie *E. coli* afin de produire de l'anticorps polyclonal anti *TgSTART* qui doit être testé sur les parasites sauvages. Ce qui n'a pas abouti car la protéine est insoluble. La protéine *TgSTART* étant l'un des partenaires lipidiques de *TgREMIND* identifiée par la GST-pull-down de *TgREMIND*, nous avons vérifié la distribution de *TgSTART* par rapport à *TgREMIND*. A l'issue de cela, nous avons constaté que les deux protéines se situent dans deux compartiments différents car elles ne colocalisent pas (Figure 22 D). Nous n'avons pas pu poursuivre les expériences pour effectuer les analyses phénotypiques sur le mutant *TgSTART*-3HA-AID car ces résultats sont obtenus à la fin de notre thèse.

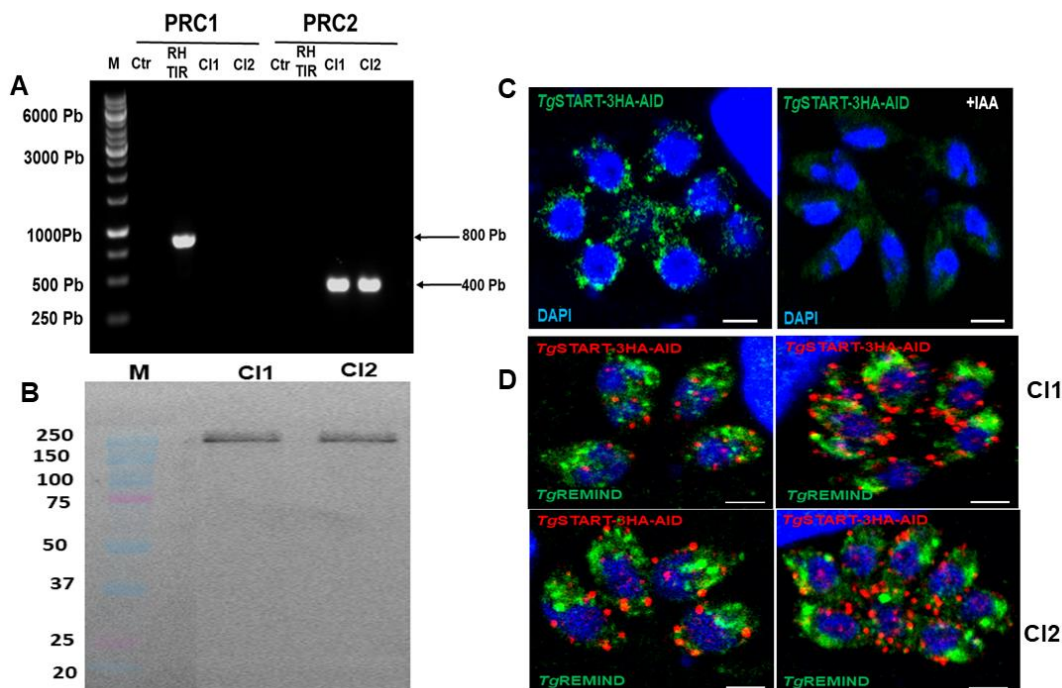


Figure 22 : Obtention du mutant knockdown *TgSTART*-3HA-AID

A : PCR d'intégration du plasmide pLinker-AID-3xHA-DHFR-loxP dans le locus de *T. gondii*

B : expression et confirmation de la taille de *TgSTART* dans les mutants knockdown

C : expression de *TgSTART* et sa dégradation en présence de l'IAA durant 28h

D : distribution de *TgSTART* par rapport à *TgREMIND* chez *T. gondii* (échelle de l'image : 3 μ M)

DISCUSSION ET CONCLUSION

La protéine *TgREMIND* (*Toxoplasma gondii Regulator of Membrane Interacting Domain*) est identifiée par l'immunoprécipitation de la protéine *TgVPS35* (Sangaré et al., 2016), laquelle est obtenue par l'immunoprécipitation de la protéine *TgSORT* (Sloves et al., 2012). Les deux protéines *TgVPS35* et *TgSORT* sont indispensables au trafic des protéines ROPs, MICs et GRAs ainsi qu'à la biogénèse des organites spécifiques chez *T. gondii* (Sloves et al., 2012) ; (Sangaré et al., 2016). Ainsi dans cette première partie de ma thèse, nous avons montré l'implication de la protéine *TgREMIND* dans la biogénèse des organites sécrétoires spécifiques de *T. gondii*.

Nous avons montré par bio-informatique que la protéine *TgREMIND* contient un domaine F-BAR et un domaine REMIND original et semblable à un domaine de la protéine SET-Binding Factor 2 (SBF2). Le domaine F-BAR est connu non seulement pour son implication dans la formation des vésicules, mais il induit également la courbure de la membrane, tout ceci en interagissant avec les phosphoinositides membranaires (Habermann Bianca, 2004) ; (Stanishneva-Konovalova et al., 2015) ; (Sharma et Caplan, 2016). Le domaine SBF2 interagit avec les protéines Rabs et fonctionne à cet effet comme un facteur pour l'échange du nucléotide guanine chez les mammifères (Yoshimura et al., 2010). Les protéines Rabs sont connues pour réguler non seulement les phosphoinositides membranaires chez les mammifères (Jean et Kiger, 2012), mais assurent également la régulation de la sécrétion et du trafic des protéines des micronèmes, des rhoptries et des granules denses chez les *Apicomplexa* (Kremer et al., 2013). Nous avons montré que la protéine *TgREMIND* s'accroche spécifiquement aux phosphatidylinositol 3,4 diphosphate, phosphatidylinositol 3,5 diphosphates, phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphates et phosphatidylinositol 4,5 diphosphates membranaires. En effet, les phospholipides intracellulaires constituent chez les parasites *Apicomplexa*, un facteur clé qui contrôlent la sécrétion des organites. L'accumulation de l'acide phosphatidique, des PIP2 et de la phosphatidylsérine membranes des parasites favorise la fusion des membranes pour la sécrétion aussi bien des rhoptries que des micronèmes chez les parasites (Martin, 2015) ; (Bullen et al., 2016) ; (Suarez et al., 2019). Le PI (4,5)P2 est connu pour recruter et activer les protéines fixateurs de PI(4,5)P2 dans la régulation du complexe SNARE,

notamment Munc13-1/2, DOC2, SECs, syntaxine1 lors de la sécrétion et du trafic des vésicules chez *T. gondii* (Farrell et al., 2012); (Martin, 2015). Tout comme *TgREMIND* fixe les plusieurs PIP_2 chez *T. gondii*, les protéines *TgRASP2* de *T. gondii* et *PfRASP2* du *P. falciparum* fixent également toutes deux à la fois PA / PIP_2 à partir de leurs domaines C2 et PH, ce qui est indispensable à la libération des protéines des rhoptries chez les parasites *Apicomplexa* (Suarez et al., 2019). De plus nos résultats de la protéomique ont révélé la présence de plusieurs protéines kinases tels que phosphatidylinositol 3, 4 kinases et phosphatidylinositol 4 phosphate 5 kinase et de Rab5 comme partenaires de *TgREMIND*. La protéine *TgREMIND* a pour autre partenaire lipidique, la protéine START (START domain containing protein), impliquée dans la fixation et la distribution des lipides chez les organismes eucaryotes. Les protéines *TgSORT* et *TgVPS35* sont entre autres, des facteurs clés indispensables du trafic intracellulaire chez *T. gondii* comme chez plusieurs autres organismes eucaryotes (Sloves et al., 2012) ; (Sangaré et al., 2016). Ces protéines sont également identifiées comme des partenaires de *TgREMIND* comme bien d'autres protéines du trafic dont les protéines SECs. Ces dernières constituent d'ailleurs les majeurs composants du complexe COPII, qui est indispensable au transport vésiculaire du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi (Wang et al., 2020). Ces résultats de la protéomique montrent l'implication cruciale de *TgREMIND* dans le trafic des protéines ROPs / RONs et GRAs qui sont majoritairement aussi rapportées par protéomique comme étant des partenaires de *TgREMIND*. Par ailleurs, un certain nombre de protéines hypothétiques récemment étudiées chez *T. gondii* sont des protéines des granules denses et possèdent des domaines trans membranaires comme la plupart des protéines sécrétées par les granules denses (Bai et al., 2018) ; (Beraki et al., 2019).

Nos résultats ont montré que la protéine *TgREMIND* est localisée au niveau du réticulum endoplasmique, dans les compartiments golgiens et post-golgien et aussi au niveau de l'endosome avec une forte concentration au niveau apical, où sont situées les rhoptries et les micronèmes chez *Toxoplasma gondii*. Les partenaires *TgSORT* et *TgVPS35* de la protéine *TgREMIND* ont été aussi identifiées dans les compartiments golgiens et le compartiment de type endosomal (Sloves et al., 2012) ; (Sangaré et al., 2016). De plus *TgREMIND* colocalise avec le récepteur *TgSORT*, les protéines de rhoptries et de granules denses.

A partir de nos expériences basées sur la génétique inverse, nous avons montré que la protéine *TgREMIND* régule les fonctions des rhoptries et des granules denses chez *T. gondii* lors de l'invasion de la cellule hôte. Chez *T. gondii*, la protéine *TgSORT* est impliquée dans le transport antérograde du Golgi/post Golgi en se fixant aux protéines ROPs et MICs lors de la biogenèse des rhoptries et des micronèmes (Sloves et al., 2012) alors que lors du transport

rétrograde, *TgVps35*-retromer intervient dans le recyclage du récepteur *TgSORT*, une fois qu'elle a relargué les ligands ROPs et MICs dans l'ELC (Sangaré et al., 2016). La protéine *TgREMIND* pourrait interagir avec sa partenaire *TgVPS35* lors du recyclage de *TgSORT* en contribuant ainsi à la biogénèse des organites. En effet, *TgSORT* et *TgVPS35*, partenaires l'une de l'autre, représentent deux facteurs essentiels du trafic et de la biogénèse des rhoptries, des micronèmes et en plus des granules denses pour *TgVPS35* (Sloves et al., 2012) ; (Sangaré et al., 2016). En effet, nous avons montré que seules les protéines des rhoptries et des granules denses sont affectées dans le mutant iKO-HA-*TgREMIND* et sont d'ailleurs les plus abondantes protéines issues du résultat de la protéomique de *TgREMIND*. Par contre, dans le mutant *TgSORT* seules les protéines des micronèmes et des rhoptries sont touchées et sont dispersées aussi bien dans le parasite que dans la cellule hôte (Sloves et al., 2012), contrairement à *TgVPS35* à partir de laquelle *TgREMIND* est identifiée et dont l'absence provoque un désordre du tri à la fois des protéines des micronèmes, des rhoptries et des granules denses chez *T. gondii* (Sangaré et al., 2016). Nous avons également montré qu'en absence de *TgREMIND*, les parasites perdent leur capacité à se déplacer par « gliding » grâce à laquelle les parasites pénètrent normalement à l'intérieur d'une cellule hôte à infecter donc pouvant conduire à l'invasion et la dissémination au sein de l'hôte infecté. Par conséquent plus de formation des plages de lyse qui sont des séries multiples d'invasion et de sortie des parasites sur environ une trentaine de cycles de division de six heures chacun à l'intérieur d'un tapis confluent des cellules HFF sur une lamelle de verre, ce qui fait apparaître des trous de lyse dans la monocouche du tapis cellulaire. Cela suggère ainsi que le cycle lytique de *T. gondii* requiert la présence de la protéine *TgREMIND*. De pareilles observations ont été faites avec les mutants de *TgSORT* (Sloves et al., 2012) et *TgVPS35* (Sangaré et al., 2016). De même l'absence de la protéine *RASP2* (*Rhoptry Apical Surface Proteins*) une protéine qui fixe les phospholipides aussi bien chez *T. gondii* que chez *P. falciparum* a non seulement conduit au blocage de l'invasion mais a induit également l'absence de la sécrétion des protéines des rhoptries chez le parasite (Suarez et al., 2019).

Nous avons montré que dans le mutant iKO-HA-*TgREMIND*, les protéines *GRA1* et *ROP1* ne décoorent plus la membrane de la vacuole parasitophore. Les protéines des granules denses sont cruciales aussi bien pour la virulence que pour la survie du parasite, en assurant la maintenance de la vacuole parasitophore et de la membrane de la vacuole parasitophore (Mercier et al., 2005) ; (Fox et al., 2019). Les protéines ROPs caractérisées par une sécrétion régulée, en plus de leurs interventions cruciales dans l'invasion de la cellule hôte, elles contribuent aussi à la mise en place de la vacuole parasitophore et de la membrane de la vacuole

parasitophore, tout comme les protéines GRAs qui en plus contribuent à l'acquisition des nutriments par le parasite (Carruthers et Boothroyd, 2007) ; (Hunter et Sibley, 2012) ; (Gold *et al.*, 2015). Les protéines ROPs et GRAs sont d'autant plus reconnues pour leur synergie pour instrumentaliser la réponse immunitaire de l'hôte et sont indispensables à la virulence du parasite pendant l'infection chronique (Fox *et al.*, 2016) ; (Behnke *et al.*, 2016). Certaines protéines des rhoptries et des granules denses principalement ROP16 et GRA16 respectivement, permettent au parasite de prendre le contrôle de la transcription des gènes de l'hôte après l'invasion. En effet, l'activation par phosphorylation des facteurs STAT3 et STAT6 responsables de la transcription des gènes chez l'hôte est assurée par ROP16, qui après sa sécrétion migre dans le noyau de l'hôte et favorise la régulation de la transcription des gènes (Ong *et al.*, 2010). Libérée dans le noyau de l'hôte infecté, GRA16 assure l'activation d'un autre facteur NFAT4 de transcription génique chez l'hôte et module l'expression de certains gènes de l'hôte (Ma *et al.*, 2014). Chez *P. falciparum*, certaines PfHP sont identifiées pour induire la production des cytokines lors de l'infection palustre et aussi pour fixer des kinases diposphates (Aguttu *et al.*, 2021). Le fait que nos résultats ont révélé un impact strictement important sur les protéines ROPs et GRAs ainsi que sur les rhoptries et les granules denses respectifs par l'absence de la protéine TgREMIND laisse présumer que TgREMIND peut avoir aussi une fonction immunologique en plus de son rôle de régulateur des fonctions des protéines des rhoptries et des granules denses dans la biogénèse des organites sécrétoires à savoir les rhoptries et les granules denses chez *T. gondii*.

La deuxième partie de mon travail a porté sur l'une des protéines à domaine START chez *T. gondii*, que nous avons nommé TgSTART. Le nombre de protéine START varie d'une espèce à une autre chez les organismes qui renferment les protéines START. Chez *P. falciparum*, un homologue *Apicomplexa* de *T. gondii* il existe quatre différentes protéines START (Gardner *et al.*, 2002). Nous avons identifié au total trois protéines START chez *T. gondii* à savoir TgSTART (TG GT1_223150), TG GT1_231000 et TG GT1_236660. En effet, nous avons focalisé cette deuxième partie de ma thèse sur cette TgSTART (TG GT1_223150) puisqu'elle a été identifiée parmi les protéines précipités par TgREMIND-GST et analysées par spectrométrie de masse (analyse protéomique). Nous avons montré que TgSTART (TG GT1_223150) partenaire lipidique de TgREMIND est caractérisée par un domaine N-terminal et un domaine C-terminal : START. En plus de ces deux domaines présents aussi chez PFA0210c de *P. falciparum* et ses orthologues PKH_020910 et PCHAS_020730 respectivement de *P. knowlesi* et de *P. chabaudi*, les protéines START de *Plasmodium SP* possèdent du côté N-terminal une séquence signale et un motif PEXEL, qui sont reconnus pour

assurer l'exportation des protéines à l'intérieure des érythrocytes de la cellule hôte infectée (Ooij et al., 2008) ; (Marti et al., 2004) ; (Hill et al., 2016). Ces protéines START de *Plasmodium spp* renferment également une extension C-terminal qui est reconnue pour réguler l'expression des protéines chez les parasites (Hill et al., 2016), ce qui est absent dans la protéine *TgSTART* (TG GT1_223150) de *T. gondii* dont les deux domaines sont reliés par une petite séquence de 47 acides aminés. A partir des parasites transgéniques et du mutant knockdown inductible de *TgSTART* (TG GT1_223150), nous avons montré que la protéine *TgSTART* (TG GT1_223150) présente une taille réelle d'environ 250 kDa ce qui dépasse deux fois la taille prédictive de la protéine START (TG GT1_231000) et est d'environ 1,7 fois supérieure à la protéine START (TG GT1_236660). Mais chez *Plasmodium SP*, la taille de la protéine START PFA0210c (PF3D7_0104200) de *P. falciparum* est de 53 kDa et n'est que légèrement supérieure à celle espérée qui est de 46,6 kDa (Ooij et al., 2013). De même PKH_020910 de *P. knowlesi* a présenté une taille de 55 kDa similaire à celle espérée qui est de 47,6 kDa (Hill et al., 2016). A partir de ces observations faites chez *Plasmodium SP*, Il est difficilement compréhensible que des modifications post traductionnelles telles que la glycolisation et la phosphorylation pourraient contribuer à cette grande différence de taille espérée (42,4 kDa) et celle obtenue (environ 250 kDa) c'est-à-dire plus de 5 fois plus grosse en taille. Ce résultat a été confirmé par deux techniques différentes (« gene knock-in et Knock down ») pour la protéine *TgSTART* (TG GT1_223150), donc il se peut que la bande 42,4 kDa espérée ne soit pas la bonne taille de *TgSTART* chez *T. gondii* mais plus tôt la taille d'environ 250 kDa. La seule explication qui nous reste pour le moment, serait une erreur dans l'annotation ou un séquençage partiel du gène *TgSTART* (TG GT1_223150) comme il est d'ailleurs indiqué pour certaines souches de *T. gondii* (<https://toxodb.org/cgi-bin/geneSrt>).

PERSPECTIVES

A l'issue des divers résultats obtenus à partir de nos expériences, il est important d'indiquer pour les deux protéines à savoir *TgREMIND* et *TgSTART* les différents aspects suivants chez *T. gondii*.

-Le fait que l'absence de la protéine *TgREMIND* affecte seulement les fonctions des protéines ROPs et GRAs, nous pourrions à terme envisager d'évaluer la virulence du mutant iKO-HA-*TgREMIND* sur les souris qui sont le modèle le plus largement développé et établi pour étudier la toxoplasmose expérimentale *in vivo*, ce qui nous permettra d'analyser les différents paramètres immunologiques.

-Le fait de créer des parasites transgéniques des partenaires lipidiques tels que les phosphatidylinositol kinases et de *TgSTART* à partir du mutant iKO-HA-*TgREMIND* permettra de connaître l'implication directe de *TgREMIND* dans la fonction de ces partenaires lipidiques chez *T. gondii*.

-L'approfondissement de l'analyse du mutant knockdown inductible *TgSTART*-3HA-AID par des études phénotypiques permettra de :

Montrer l'importance de la protéine *TgSTART* dans le trafic intracellulaire des facteurs de virulence tels que les protéines des rhoptries, des micronèmes et des granules denses et également sur la biogénèse des organites sécrétoires spécifiques associés à ces facteurs de virulence.

Explorer peut-être des rôles possibles de *TgSTART* dans la formation du complexe membranaire interne, la membrane plasmique et la vacuole parasitophore chez *T. gondii*.

-L'identification des partenaires de *TgSTART* favorisera la bonne compréhension du rôle de la protéine chez *T. gondii*.

-Le gène *TgSTART* étant un partenaire du gène *TgREMIND*, l'obtention du Knock-in du gène *TgREMIND* dans le mutant knockdown inductible *TgSTART*-3HA-AID permettra d'observer l'effet de l'absence de *TgSTART* sur la fonction de la protéine *TgREMIND*.

-La production de la protéine *TgSTART* recombinante dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui se déroule en collaboration avec Dr José Luis VAZQUEZ-IBAR (I2BC, CEA), nous permettra dans un premier temps d'identifier la nature de lipide que fixe la protéine *TgSTART* chez *T. gondii*. Dans un second temps l'anticorps polyclonal anti *TgSTART* sera produit grâce à la protéine recombinante obtenue, ce qui va permettre de confirmer la taille de la protéine *TgSTART* chez *T. gondii*.

Références Bibliographiques

- Abubakar, Yakubu Saddeeq, Wenhui Zheng, Stefan Olsson, et Jie Zhou. 2017. « Updated insight into the physiological and pathological roles of the retromer complex ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (8): 1601.
- Adl Sina M., Brian S. Leander, Alastair G. B. Simpson, John M. Archibald, O. Roger. Anderson, David Bass, Samuel S. Bowser, et al. 2007. « Diversity, Nomenclature, and Taxonomy of Protists ». Édité par Tim Collins et Jack Sullivan. *Systematic Biology* 56 (4): 684-89. <https://doi.org/10.1080/10635150701494127>.
- Agop-Nersesian, Carolina, Saskia Egarter, Gordon Langsley, Bernardo J. Foth, David J. P. Ferguson, et Markus Meissner. 2010. « Biogenesis of the Inner Membrane Complex Is Dependent on Vesicular Transport by the Alveolate Specific GTPase Rab11B ». Édité par L. David Sibley. *PLoS Pathogens* 6 (7): e1001029. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001029>.
- Aguttu Claire, Brenda Apio Okech, Ambrose Mukisa, et George William Lubega. 2021. « Screening and Characterization of Hypothetical Proteins of *Plasmodium falciparum* as Novel Vaccine Candidates in the Fight against Malaria Using Reverse Vaccinology ». *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 19 (1): 103. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00199-y>.
- Ajzenberg Daniel, Nadine Cogné, Luc Paris, Marie-Hélène Bessières, Philippe Thulliez, Denis Filisetti, Hervé Pelloux, Pierre Marty, et Marie-Laure Dardé. 2002. « Genotype of 86 *Toxoplasma Gondii* Isolates Associated with Human Congenital Toxoplasmosis, and Correlation with Clinical Findings ». *The Journal of Infectious Diseases* 186 (5): 684-89. <https://doi.org/10.1086/342663>.
- Alexander David L, Jeffrey Mital, Gary E Ward, Peter Bradley, et John C Boothroyd. 2005. « Identification of the Moving Junction Complex of *Toxoplasma gondii* : A Collaboration between Distinct Secretory Organelles ». Édité par Kasturi Haldar. *PLoS Pathogens* 1 (2): e17. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010017>.
- Aliberti Julio, Caetano Sousa, Marco Schito, Sara Hieny, Timothy Wells, Gary Huffnagle, et Alan Sher. 2000. « CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha + dendritic cells ». *Nature immunology* 1 (août): 83-87. <https://doi.org/10.1038/76957>.

- Alpy F. 2005. « Give Lipids a START: The StAR-Related Lipid Transfer (START) Domain in Mammals ». *Journal of Cell Science* 118 (13): 2791-2801. <https://doi.org/10.1242/jcs.02485>.
- Alpy Fabien, François Legueux, Laurent Bianchetti, et Catherine Tomasetto. 2009. « Les protéines à domaine START, des trafiquants intracellulaires de lipides ». *médecine/sciences* 25 (2): 181-91. <https://doi.org/10.1051/medsci/2009252181>.
- Alpy Fabien, Marie-Elisabeth Stoeckel, Andrée Dierich, Jean-Michel Escola, Corinne Wendling, Marie-Pierre Chenard, Marie T. Vanier, Jean Gruenberg, Catherine Tomasetto, et Marie-Christine Rio. 2001. « The Steroidogenic Acute Regulatory Protein Homolog MLN64, a Late Endosomal Cholesterol-Binding Protein* ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (6): 4261-69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006279200>.
- Alpy Fabien, et Catherine Tomasetto. 2014. « START Ships Lipids across Interorganelle Space ». *Biochimie* 96 (janvier): 85-95. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.015>.
- Altschul S F, T L Madden, A A Schäffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller, et D J Lipman. 1997. « Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. » *Nucleic Acids Research* 25 (17): 3389-3402.
- Andrade Warrison A., Maria do Carmo Souza, Espiridion Ramos-Martinez, Kamalpreet Nagpal, Miriam S. Dutra, Mariane B. Melo, Daniella C. Bartholomeu, Sankar Ghosh, Douglas T. Golenbock, et Ricardo T. Gazzinelli. 2013. « Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice ». *Cell host & microbe* 13 (1): 42-53.
- Aquilini Eleonora, Marta Mendonça Cova, Shrawan Kumar Mageswaran, Nicolas Dos Santos Pacheco, Daniela Sparvoli, Diana Marcela Penarete-Vargas, Rania Najm, et al. 2021. « An Alveolata Secretory Machinery Adapted to Parasite Host Cell Invasion ». *Nature Microbiology* 6 (4): 425-34. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00854-z>.
- Arroyo-Olarte Ruben D., Jos F. Brouwers, Arunakar Kuchipudi, J. Bernd Helms, Aindrila Biswas, Ildiko R. Dunay, Richard Lucius, et Nishith Gupta. 2015. « Phosphatidylthreonine and Lipid-Mediated Control of Parasite Virulence ». Édité par Gary E Ward. *PLOS Biology* 13 (11): e1002288. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002288>.
- Attias Márcia, Dirceu E. Teixeira, Marlene Benchimol, Rossiane C. Vommaro, Paulo Henrique Crepaldi, et Wanderley De Souza. 2020. « The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations ». *Parasites & Vectors* 13 (novembre). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04445-z>.

- Avci Muhittin Eftal, Ferhat Arslan, Şinasi Çiftçi, Ali Ekiz, Abdullah Tüten, Gökhan Yildirim, et Rıza Madazli. 2016. « Role of Spiramycin in Prevention of Fetal Toxoplasmosis ». *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians* 29 (13): 2073-76. <https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1074998>.
- Ayong Lawrence, Gabriel Pagnotti, Angelica Barrero Tobon, et Debopam Chakrabarti. 2007. « Identification of *Plasmodium falciparum* Family of SNAREs ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 152 (2): 113-22. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.12.007>.
- Azzouz N., F. Kamena, P. Laurino, R. Kikkeri, C. Mercier, M.-F. Cesbron-Delauw, J.-F. Dubremetz, L. De Cola, et P. H. Seeberger. 2013. « *Toxoplasma gondii* Secretory Proteins Bind to Sulfated Heparin Structures ». *Glycobiology* 23 (1): 106-20. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws134>.
- Bai Meng-Jie, Jin-Lei Wang, Hany M. Elsheikha, Qin-Li Liang, Kai Chen, Lan-Bi Nie, et Xing-Quan Zhu. 2018. « Functional Characterization of dense granule Proteins in *Toxoplasma gondii* RH Strain Using CRISPR-Cas9 System ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00300>.
- Baldassare Joseph J., Yanhua Bi, et Clifford J. Bellone. 1999. « The Role of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase in IL-1 β Transcription ». *The Journal of Immunology* 162 (9): 5367-73.
- Balderhaar Henning J. kleine, et Christian 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>.
- Balta Igori, Adela Marcu, Mark Linton, Carmel Kelly, Lavinia Stef, Ioan Pet, Patrick Ward, et al. 2021. « The in Vitro and in Vivo Anti-Virulent Effect of Organic Acid Mixtures against *Eimeria Tenella* and *Eimeria Bovis* ». *Scientific Reports* 11 (1): 16202. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95459-9>.
- Barta John R. 2001. « Molecular Approaches for Inferring Evolutionary Relationships among Protistan Parasites ». *Veterinary Parasitology* 101 (3-4): 175-86. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00564-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00564-7).
- Bean Bjorn D. M., Michael Davey, Jamie Snider, Matthew Jessulat, Viktor Deineko, Matthew Tinney, Igor Stagljar, Mohan Babu, et Elizabeth Conibear. 2015. « Rab5-family

- guanine nucleotide exchange factors bind retromer and promote its recruitment to endosomes ». *Molecular Biology of the Cell* 26 (6): 1119-28. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-08-1281>.
- Beck Hans-Peter, Damer Blake, Marie-Laure Dardé, Ingrid Felger, Susana Pedraza-Díaz, Javier Regidor-Cerrillo, Mercedes Gómez-Bautista, et al. 2009. « Molecular Approaches to Diversity of Populations of *Apicomplexan* Parasites ». *International Journal for Parasitology* 39 (2): 175-89. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.10.001>.
- Beck Josh R., Connie Fung, Kurtis W. Straub, Isabelle Coppens, Ajay A. Vashisht, James A. Wohlschlegel, et Peter J. Bradley. 2013. « A *Toxoplasma* palmitoyl acyl transferase and the palmitoylated armadillo repeat protein TgARO govern apical rhoptry tethering and reveal a critical role for the rhoptries in host cell invasion but not egress ». *PLoS pathogens* 9 (2): e1003162.
- Beckers C J, J F Dubremetz, O Mercereau-Puijalon, et K A Joiner. 1994. « The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. » *Journal of Cell Biology* 127 (4): 947-61. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.4.947>.
- Behnke Michael S., J. P. Dubey, et L. David Sibley. 2016. « Genetic mapping of pathogenesis determinants in *Toxoplasma gondii* ». *Annual review of microbiology* 70: 63-81.
- Ben Chaabene, Rouaa, Gaëlle Lentini, et Dominique Soldati-Favre. 2021. « Biogenesis and Discharge of the Rhoptries: Key Organelles for Entry and Hijack of Host Cells by the Apicomplexa ». *Molecular Microbiology* 115 (3): 453-65. <https://doi.org/10.1111/mmi.14674>.
- Beraki Tsebaot, Xiaoyu Hu, Malgorzata Broncel, Joanna C. Young, William J. O'Shaughnessy, Dominika Borek, Moritz Treeck, et Michael L. Reese. 2019. « Divergent Kinase Regulates Membrane Ultrastructure of the *Toxoplasma* Parasitophorous Vacuole ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (13): 6361-70. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816161116>.
- Bergman Lawrence W., Karine Kaiser, Hisashi Fujioka, Isabelle Coppens, Thomas M. Daly, Sarah Fox, Kai Matuschewski, Victor Nussenzweig, et Stefan H. I. Kappe. 2003. « Myosin A Tail Domain Interacting Protein (MTIP) Localizes to the Inner Membrane Complex of Plasmodium Sporozoites ». *Journal of Cell Science* 116 (Pt 1): 39-49. <https://doi.org/10.1242/jcs.00194>.
- Besteiro Sébastien, Justine Bertrand-Michel, Maryse Lebrun, Henri Vial, et Jean-François Dubremetz. 2008. « Lipidomic Analysis of *Toxoplasma Gondii* Tachyzoites Rhoptries:

- Further Insights into the Role of Cholesterol ». *The Biochemical Journal* 415 (1): 87-96. <https://doi.org/10.1042/BJ20080795>.
- Besteiro Sébastien, Christen M. Klinger, Markus Meissner, et Vern B. Carruthers. 2020. « Chapter 15 - Endomembrane Trafficking Pathways in *Toxoplasma* ». In *Toxoplasma gondii (Third Edition)*, édité par Louis M. Weiss et Kami Kim, 705-41. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00015-3>.
- Beutler Bruce, Zhengfan Jiang, Philippe Georgel, Karine Crozat, Ben Croker, Sophie Rutschmann, Xin Du, et Kasper Hoebe. 2006. « Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large ». *Annual review of immunology* 24 (février): 353-89. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090552>.
- Biddau Marco, Anne Bouchut, Jack Major, Tracy Saveria, Julie Tottey, Ojore Oka, Marcel van-Lith, et al. 2018. « Two Essential Thioredoxins Mediate Apicoplast Biogenesis, Protein Import, and Gene Expression in *Toxoplasma gondii* ». *PLOS Pathogens* 14 (2): e1006836. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006836>.
- Bisio Hugo, Rouaa Ben Chaabene, Ricarda Sabitzki, Bohumil Maco, Jean Baptiste Marq, Tim-Wolf Gilberger, Tobias Spielmann, et Dominique Soldati-Favre. 2020. « The ZIP Code of Vesicle Trafficking in *Apicomplexa*: SEC1/Munc18 and SNARE Proteins ». Édité par Louis M. Weiss. *MBio* 11 (5): e02092-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02092-20>.
- Bisio Hugo, Aarti Krishnan, Jean-Baptiste Marq, et Dominique Soldati-Favre. 2022. « *Toxoplasma gondii* Phosphatidylserine Flippase Complex ATP2B-CDC50.4 Critically Participates in Microneme Exocytosis ». *PLoS Pathogens* 18 (3): e1010438. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010438>.
- Black Michael W., et John C. Boothroyd. 2000. « Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii* ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (3): 607-23.
- Blader Ira, Bradley Coleman, Chun-Ti Chen, et Marc-Jan Gubbels. 2015. « The lytic cycle of *Toxoplasma gondii* : 15 years later ». *Annual review of microbiology* 69 (octobre): 463-85. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>.
- Blume Martin, et Frank Seeber. 2018. « Metabolic interactions between *Toxoplasma gondii* and its host ». *F1000Research* 7 (octobre). <https://doi.org/10.12688/f1000research.16021.1>.
- Bonifacino Juan S. 2014. « Adaptor Proteins Involved in Polarized Sorting ». *The Journal of Cell Biology* 204 (1): 7-17. <https://doi.org/10.1083/jcb.201310021>.
- Boothroyd John C., et Jean-Francois Dubremetz. 2008. « Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma rhoptries* ». *Nature Reviews Microbiology* 6 (1): 79-88.

- Boothroyd John C., et Mohamed-Ali Hakimi. 2020. « Effectors Produced by Rhoptries and dense granules : An Intense Conversation between Parasite and Host in Many Languages ». In *Toxoplasma gondii*, 789-806. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00017-7>.
- Boothroyd John C., Adrian Hehl, Laura J. Knoll, et Ian D. Manger. 1998. « The Surface of *Toxoplasma* : More and Less ». *International Journal for Parasitology* 28 (1): 3-9. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00182-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00182-3).
- Bougdour Alexandre, Eric Durandau, Marie-Pierre Brenier-Pinchart, Philippe Ortet, Mohamed Barakat, Sylvie Kieffer, Aurélie Curt-Varesano, et al. 2013. « Host Cell Subversion by *Toxoplasma* GRA16, an Exported Dense Granule Protein That Targets the Host Cell Nucleus and Alters Gene Expression ». *Cell Host & Microbe* 13 (4): 489-500. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.002>.
- Bougdour Alexandre, Isabelle Tardieux, et Mohamed-Ali Hakimi. 2014. « *Toxoplasma* Exports Dense Granule Proteins beyond the Vacuole to the Host Cell Nucleus and Rewires the Host Genome Expression ». *Cellular Microbiology* 16 (3): 334-43. <https://doi.org/10.1111/cmi.12255>.
- Bradley Peter J., et L. David Sibley. 2007. « Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors ». *Current opinion in microbiology* 10 (6): 582-87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.013>.
- Bradley Peter J., Chris Ward, Stephen J. Cheng, David L. Alexander, Susan Coller, Graham H. Coombs, Joe Dan Dunn, et al. 2005. « Proteomic Analysis of Rhoptry Organelles Reveals Many Novel Constituents for Host-Parasite Interactions in *Toxoplasma gondii* ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (40): 34245-58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504158200>.
- Braun Laurence, Marie-Pierre Brenier-Pinchart, Manickam Yogavel, Aurélie Curt-Varesano, Rose-Laurence Curt-Bertini, Tahir Hussain, Sylvie Kieffer-Jaquinod, et al. 2013. « A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation ». *Journal of Experimental Medicine* 210 (10): 2071-86. <https://doi.org/10.1084/jem.20130103>.
- Braun Laurence, Laetitia Travier, Sylvie Kieffer, Karine Musset, Jérôme Garin, Corinne Mercier, et Marie-France Cesbron-Delauw. 2008. « Purification of *Toxoplasma dense granule* Proteins Reveals That They Are in Complexes throughout the Secretory Pathway ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 157 (1): 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.09.002>.

- Breinich Manuela S., David J. P. Ferguson, Bernardo J. Foth, Giel G. van Dooren, Maryse Lebrun, Doris V. Quon, Boris Striepen, Peter J. Bradley, Friedrich Frischknecht, Vern B. Carruthers, 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>.
- Brouwer A. P. M. de, J. Westerman, A. Kleinnijenhuis, L. E. Bevers, B. Roelofsen, et K. W. A. Wirtz. 2002. « Clofibrate-Induced Relocation of Phosphatidylcholine Transfer Protein to Mitochondria in Endothelial Cells ». *Experimental Cell Research* 274 (1): 100-111. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5460>.
- Brown, Kevin M., Shaojun Long, et L. David Sibley. 2018. « Conditional Knockdown of Proteins Using Auxin-inducible Degron (AID) Fusions in *Toxoplasma gondii* ». *Bio-protocol* 8 (4): e2728-e2728.
- Bulankina Anna V., Anke Deggerich, Dirk Wenzel, Kudzai Mutenda, Julia G. Wittmann, Markus G. Rudolph, Koert N.J. Burger, et Stefan Höning. 2009. « TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets ». *Journal of Cell Biology* 185 (4): 641-55. <https://doi.org/10.1083/jcb.200812042>.
- Bullen Hayley E., Yonggen Jia, Yoshiki Yamaro-Botté, Hugo Bisio, Ou Zhang, Natacha Klages Jemelin, Jean-Baptiste Marq, Vern Carruthers, Cyrille Y. Botté, et Dominique Soldati-Favre. 2016. « Phosphatidic Acid-Mediated Signaling Regulates Microneme Secretion in *Toxoplasma* ». *Cell Host & Microbe* 19 (3): 349-60. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.006>.
- Burd Christopher, et Peter J. Cullen. 2014. « Retromer: A Master Conductor of Endosome Sorting ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (2): a016774. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016774>.
- Buzoni-Gatel, Dominique, Jean-François Dubremetz, et Catherine Werts. 2008. « Manipulation du système immunitaire par le parasite *Toxoplasma gondii* ». *médecine/sciences* 24 (2): 191-96. <https://doi.org/10.1051/medsci/2008242191>.
- Cadigan Ken M., et Marian L. Waterman. 2012. « TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus ». *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4 (11): a007906.
- Caffaro Carolina E., et John C. Boothroyd. 2011. « Evidence for Host Cells as the Major Contributor of Lipids in the Intravacuolar Network of *Toxoplasma*-Infected Cells ». *Eukaryotic Cell* 10 (8): 1095-99. <https://doi.org/10.1128/EC.00002-11>.
- Calderaro Adriana, Giovanna Piccolo, Chiara Gorrini, Sabina Rossi, Sara Montecchini, Maria Loretana Dell'Anna, Flora De Conto, Maria Cristina Medici, Carlo Chezzi, et Maria

- Cristina Arcangeletti. 2013. « Accurate Identification of the Six Human *Plasmodium* Spp. Causing Imported Malaria, Including *Plasmodium Ovale* Wallikeri and *Plasmodium Knowlesi* ». *Malaria Journal* 12 (1): 321. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-321>.
- Calderon-Dominguez Maria, Gregorio Gil, Miguel Angel Medina, William M. Pandak, et Daniel Rodríguez-Agudo. 2014. « The StarD4 subfamily of steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer (START) domain proteins: new players in cholesterol metabolism ». *The international journal of biochemistry & cell biology* 49 (avril): 64-68. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.01.002>.
- Campo Javier del, Thierry J. Heger, Raquel Rodríguez-Martínez, Alexandra Z. Worden, Thomas A. Richards, Ramon Massana, et Patrick J. Keeling. 2019. « Assessing the Diversity and Distribution of Apicomplexans in Host and Free-Living Environments Using High-Throughput Amplicon Data and a Phylogenetically Informed Reference Framework ». *Frontiers in Microbiology* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02373>.
- Cao Canhong, Jonathan M. Backer, Jocelyn Laporte, Edward J. Bedrick, et Angela Wandinger-Ness. 2008. « Sequential Actions of Myotubularin Lipid Phosphatases Regulate Endosomal PI(3)P and Growth Factor Receptor Trafficking ». Édité par Sandra Schmid. *Molecular Biology of the Cell* 19 (8): 3334-46. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-04-0367>.
- Carey, Kimberly L., Artemio M. Jongco, Kami Kim, et Gary E. Ward. 2004. « The *Toxoplasma gondii* Rhoptry Protein ROP4 Is Secreted into the Parasitophorous Vacuole and Becomes Phosphorylated in Infected Cells ». *Eukaryotic Cell* 3 (5): 1320-30. <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1320-1330.2004>.
- Carruthers V. B. 1999. « Armed and Dangerous : *Toxoplasma gondii* Uses an Arsenal of Secretory Proteins to Infect Host Cells ». *Parasitology International* 48 (1): 1-10. [https://doi.org/10.1016/s1383-5769\(98\)00042-7](https://doi.org/10.1016/s1383-5769(98)00042-7).
- Carruthers V. B., et L. D. Sibley. 1997. « Sequential Protein Secretion from Three Distinct Organelles of *Toxoplasma gondii* Accompanies Invasion of Human Fibroblasts ». *European Journal of Cell Biology* 73 (2): 114-23.
- Carruthers V B, et L D Sibley. 1997. « Sequential Protein Secretion from Three Distinct Organelles of *Toxoplasma gondii* Accompanies Invasion of Human Fibroblasts ». *European Journal of Cell Biology* 73 (2): 114-23.

- Carruthers V. B., et Y. Suzuki. 2007. « Effects of *Toxoplasma gondii* Infection on the Brain ». *Schizophrenia Bulletin* 33 (3): 745-51. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbm008>.
- Carruthers Vern B. 2002. « Host Cell Invasion by the Opportunistic Pathogen *Toxoplasma gondii* ». *Acta Tropica* 81 (2): 111-22. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(01\)00201-7](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(01)00201-7).
- Carruthers Vern B., et Fiona M. Tomley. 2008. « Receptor-ligand interaction and invasion: Microneme proteins in *apicomplexans* ». *Sub-cellular biochemistry* 47: 33-45.
- Carruthers Vern, et John C Boothroyd. 2007. « Pulling Together: An Integrated Model of *Toxoplasma* Cell Invasion ». *Current Opinion in Microbiology*, Host-microbe interactions: bacteria, 10 (1): 83-89. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.017>.
- Cérède Odile, Jean François Dubremetz, Daniel Bout, et Maryse Lebrun. 2002. « The *Toxoplasma gondii* protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin ». *The EMBO Journal* 21 (11): 2526-36. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2526>.
- Cesbron-Delauw M. F. 1994. « Dense-Granule Organelles of *Toxoplasma gondii*: Their Role in the Host-Parasite Relationship ». *Parasitology Today* 10 (8): 293-96. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(94\)90078-7](https://doi.org/10.1016/0169-4758(94)90078-7).
- Charron Audra J., et L. David Sibley. 2002. « Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* ». *Journal of cell science* 115 (15): 3049-59.
- Chasen Nathan M., Beejan Asady, Leandro Lemgruber, Rossiane C. Vommaro, Jessica C. Kissinger, Isabelle Coppens, et Silvia NJ Moreno. 2017. « A glycosylphosphatidylinositol-anchored carbonic anhydrase-related protein of *Toxoplasma gondii* is important for rhoptry biogenesis and virulence ». *MSphere* 2 (3): e00027-17.
- Chaturvedi Sudha, Huilin Qi, David Coleman, Anna Rodriguez, Phyllis I. Hanson, Boris Striepen, David S. Roos, et 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>.
- Chen Allan L., Andy S. Moon, Hannah N. Bell, Amy S. Huang, Ajay A. Vashisht, Justin Y. Toh, Andrew H. Lin, et al. 2017. « Novel insights into the composition and function of the *Toxoplasma* IMC sutures ». *Cellular microbiology* 19 (4): 10.1111/cmi.12678. <https://doi.org/10.1111/cmi.12678>.
- Chen Min, Lijie Yao, Lijuan Zhou, Pei Yang, Weihao Zou, Liqing Xu, Shengmin Li, et Hongjuan Peng. 2022. « *Toxoplasma gondii* ROP18I Inhibits Host Innate Immunity

- through CGAS-STING Signaling ». *The FASEB Journal* 36 (2): e22171. <https://doi.org/10.1096/fj.202101347R>.
- Chiang Chi-Wu, Nicola Carter, William J. Sullivan, Robert GK Donald, David S. Roos, Fardos NM Naguib, Mahmoud H. El Kouni, Buddy Ullman, et Craig M. Wilson. 1999. « The adenosine transporter of *Toxoplasma gondii*: identification by insertional mutagenesis, cloning, and recombinant expression ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (49): 35255-61.
- Coffey Michael J, Brad E Sleebbs, Alessandro D Uboldi, Alexandra Garnham, Magdalena Franco, Nicole D Marino, Michael W Panas, et al. 2015. « An aspartyl protease defines a novel pathway for export of *Toxoplasma* proteins into the host cell ». Édité par Axel A Brakhage. *eLife* 4 (novembre): e10809. <https://doi.org/10.7554/eLife.10809>.
- Coleman Bradley I., Sudeshna Saha, Seiko Sato, Klemens Engelberg, David J. P. Ferguson, Isabelle Coppens, Melissa B. Lodoen, et Marc-Jan Gubbels. 2018. « A Member of the Ferlin Calcium Sensor Family Is Essential for *Toxoplasma gondii* Rhoptry Secretion ». *MBio* 9 (5): e01510-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01510-18>.
- Collins Christine R., Fiona Hackett, Malcolm Strath, Maria Penzo, Chrislaine Withers-Martinez, David A. Baker, et Michael J. Blackman. 2013. « Malaria Parasite CGMP-Dependent Protein Kinase Regulates Blood Stage Merozoite Secretory Organelle Discharge and Egress ». Édité par L. David Sibley. *PLoS Pathogens* 9 (5): e1003344. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003344>.
- Cook Tuesday, David Roos, Mary Morada, Guan Zhu, Janet S Keithly, Jean E Feagin, Gang Wu, et Nigel Yarlett. 2007. « Divergent Polyamine Metabolism in the *Apicomplexa* ». *Microbiology* 153 (4): 1123-30. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/001768-0>.
- Coppens Isabelle. 2014. « Exploitation of Auxotrophies and Metabolic Defects in *Toxoplasma* as Therapeutic Approaches ». *International Journal for Parasitology* 44 (2): 109-20. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.09.003>.
- Coppens Isabelle, et Keith A. Joiner. 2003. « Host but Not Parasite Cholesterol Controls *Toxoplasma* Cell Entry by Modulating Organelle Discharge ». *Molecular Biology of the Cell* 14 (9): 3804-20. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-12-0830>.
- Coppens Isabelle, Anthony P. Sinai, et Keith A. Joiner. 2000. « *Toxoplasma gondii* Exploits Host Low-Density Lipoprotein Receptor-Mediated Endocytosis for Cholesterol Acquisition ». *The Journal of Cell Biology* 149 (1): 167-80.
- Coppin Alexandra, Florence Dzierszinski, Sandra Legrand, Marlène Mortuaire, David Ferguson, et Stanislas Tomavo. 2003. « Developmentally Regulated Biosynthesis of

- Carbohydrate and Storage Polysaccharide during Differentiation and Tissue Cyst Formation in *Toxoplasma gondii* ». *Biochimie*, Free and conjugated sugars. Biochemistry and molecular biology. Dedicated to Andre Verbert and Jean Agneray, 85 (3): 353-61. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(03\)00076-2](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(03)00076-2).
- Costa Damien, Romy Razakandrainibe, Stéphane Valot, Margot Vannier, Marc Sautour, Louise Basmaciyan, Gilles Gargala, Venceslas Viller, Denis Lemeteil, et Jean-Jacques Ballet. 2020. « Epidemiology of Cryptosporidiosis in France from 2017 to 2019 ». *Microorganisms* 8 (9): 1358.
- Couso-Pérez S., F. Bárcena-Varela de Limia, E. Ares-Mazás, et H. Gómez-Couso. 2020. « First Report of Zoonotic *Cryptosporidium parvum* GP60 Subtypes IIAA15G2R1 and IIAA16G3R1 in Wild Ponies from the Northern Iberian Peninsula ». *Parasitology Research* 119 (1): 249-54. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06529-x>.
- Cruvinel Leonardo Bueno, João Eduardo Nicaretta, Thiago de Souza Azeredo Bastos, Luiz Felipe Monteiro Couto, Jordana Belos Dos Santos, Dina María Beltrán Zapa, Alliny Souza de Assis Cavalcante, et al. 2018. « Eimeria Species in Dairy and Beef Cattle of Different Ages in Goiás State, Brazil ». *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria Brazilian Journal of Veterinary Parasitology : Orgao Oficial Do Colegio Brasileiro De Parasitologia Veterinaria* 27 (2): 169-76. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180038>.
- Curt-Varesano Aurélie, Laurence Braun, Caroline Ranquet, Mohamed-Ali Hakimi, et Alexandre Bougdour. 2016. « The Aspartyl Protease TgASP5 Mediates the Export of the *Toxoplasma* GRA16 and GRA24 Effectors into Host Cells ». *Cellular Microbiology* 18 (2): 151-67. <https://doi.org/10.1111/cmi.12498>.
- Dacks Joel B., Andrew A. Peden, et Mark C. Field. 2009. « Evolution of Specificity in the Eukaryotic Endomembrane System ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Molecular and Cellular Evolution: A Celebration of the 200th Anniversary of the Birth of Charles Darwin*, 41 (2): 330-40. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.08.041>.
- Darvill Nick, David J. Dubois, Sarah L. Rouse, Pierre-Mehdi Hammoudi, Tom Blake, Stefi Benjamin, Bing Liu, Dominique Soldati-Favre, et Steve Matthews. 2018. « Structural Basis of Phosphatidic Acid Sensing by APH in Apicomplexan Parasites ». *Structure (London, England: 1993)* 26 (8): 1059-1071.e6. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.05.001>.

- Das Koushik, et Tomoyoshi Nozaki. 2018. « Non-vesicular Lipid Transport Machinery in *Entamoeba histolytica* ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00315>.
- Daumke Oliver, Aurélien Roux, et Volker Haucke. 2014. « BAR Domain Scaffolds in Dynamin-Mediated Membrane Fission ». *Cell* 156 (5): 882-92. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.017>.
- De Koning Harry P., Mohammed I. Al-Salabi, Adrian M. Cohen, Graham H. Coombs, et Jonathan M. Wastling. 2003. « Identification and characterisation of high affinity nucleoside and nucleobase transporters in *Toxoplasma gondii* ». *International journal for parasitology* 33 (8): 821-31.
- Dean, Paul, Peter Major, Sirintra Nakjang, Robert P. Hirt, et T. Martin Embley. 2014. « Transport proteins of parasitic protists and their role in nutrient salvage ». *Frontiers in plant science* 5: 153.
- Deffieu, Maika S., Tchilabalo Dilezitoko Alayi, Christian Slomianny, et Stanislas Tomavo. 2019. « The *Toxoplasma gondii* dense granule Protein TgGRA3 Interacts with Host Golgi and Dysregulates Anterograde Transport ». *Biology Open*, janvier, bio.039818. <https://doi.org/10.1242/bio.039818>.
- Del Carmen, M. González, M. Mondragon, S. Gonzalez, et R. Mondragon. 2009. « Induction and regulation of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* ». *Cellular microbiology* 11 (6): 967-82.
- Delahaye, Jared L., Olivia K. Foster, Annalise Vine, Daniel S. Saxton, Thomas P. Curtin, Hannah Somhegyi, Rebecca Salesky, et Greg J. Hermann. 2014. « Caenorhabditis elegans HOPS and CCZ-1 mediate trafficking to lysosome-related organelles independently of RAB-7 and SAND-1 ». *Molecular Biology of the Cell* 25 (7): 1073-96. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-09-0521>.
- Delair Emmanuelle, Paul Latkany, A. Gwendolyn Noble, Peter Rabiah, Rima McLeod, et Antoine Brézin. 2011. « Clinical Manifestations of Ocular Toxoplasmosis ». *Ocular Immunology and Inflammation* 19 (2): 91-102. <https://doi.org/10.3109/09273948.2011.564068>.
- Demircioglu F. Esra, Pawel Burkhardt, et Dirk Fasshauer. 2014. « The SM protein Sly1 accelerates assembly of the ER–Golgi SNARE complex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (38): 13828-33. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408254111>.
- Deng Lei, Wei Li, Zhijun Zhong, Chao Gong, Xuefeng Cao, Yuan Song, Wuyou Wang, et al. 2017. « Occurrence and Genetic Characteristics of *Cryptosporidium Hominis* and

- Cryptosporidium Andersoni* in Horses from Southwestern China ». *Journal of Eukaryotic Microbiology* 64 (5): 716-20. <https://doi.org/10.1111/jeu.12399>.
- Denkers Eric Y, Barbara A Butcher, Laura Del Rio, et Soumaya Bennouna. 2004. « Neutrophils, Dendritic Cells and *Toxoplasma* ». *International Journal for Parasitology* 34 (3): 411-21. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.11.001>.
- DeRocher Amy E., Isabelle Coppens, Anuradha Karnataki, Luke A. Gilbert, Michael E. Rome, Jean E. Feagin, Peter J. Bradley, et Marilyn Parsons. 2008. « A Thioredoxin Family Protein of the Apicoplast Periphery Identifies Abundant Candidate Transport Vesicles in *Toxoplasma gondii* ». *Eukaryotic Cell* 7 (9): 1518-29. <https://doi.org/10.1128/EC.00081-08>.
- Dewangan, Pravin S., Tsebaot G. Beraki, E. Ariana Paiz, Delia Appiah Mensah, Zhe Chen, et Michael L. Reese. 2022. « Divergent Kinase WNG1 Is Regulated by Phosphorylation of an Atypical Activation Sub-Domain ». *Biochemical Journal* 479 (17): 1877-89. <https://doi.org/10.1042/BCJ20220076>.
- Dobrowolski J. M., et L. D. Sibley. 1996. « *Toxoplasma* Invasion of Mammalian Cells Is Powered by the Actin Cytoskeleton of the Parasite ». *Cell* 84 (6): 933-39. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81071-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81071-5).
- Dodonova S. O., P. Diestelkoetter-Bachert, Alexander von Appen, W. J. H. Hagen, R. Beck, M. Beck, F. Wieland, et John AG Briggs. 2015. « A structure of the COPI coat and the role of coat proteins in membrane vesicle assembly ». *Science* 349 (6244): 195-98.
- Dubey J. P., D. S. Lindsay, et C. A. Speer. 1998. « Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts ». *Clinical Microbiology Reviews* 11 (2): 267-99.
- Dubey J. P., Nancy L. Miller, et J. K. Frenkel. 1970. « THE *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces ». *Journal of Experimental Medicine* 132 (4): 636-62. <https://doi.org/10.1084/jem.132.4.636>.
- Dubey J.P. 2009. « History of the Discovery of the Life Cycle of *Toxoplasma gondii* ». *International Journal for Parasitology* 39 (8): 877-82. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.01.005>.
- Dubey Rashmi, Brooke Harrison, Sriveny Dangoudoubiyam, Giulia Bandini, Katherine Cheng, Aziz Kosber, Carolina Agop-Nersesian, et al. 2017. « Differential Roles for Inner Membrane Complex Proteins across *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis Neurona* Development ». Édité par Aaron P. Mitchell. *MSphere* 2 (5): e00409-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00409-17>.

- Dubois, David, Stella Fernandes, Souad Amiar, Sheena Dass, Nicholas J. Katris, Cyrille Y. Botté, et Yoshiki Yamaro-Botté. 2018. « *Toxoplasma gondii* Acetyl-CoA Synthetase Is Involved in Fatty Acid Elongation (of Long Fatty Acid Chains) during Tachyzoite Life Stages ». *Journal of Lipid Research* 59 (6): 994-1004. <https://doi.org/10.1194/jlr.M082891>.
- Dubois David J., et Dominique Soldati-Favre. 2019. « Biogenesis and Secretion of Micronemes in *Toxoplasma gondii* ». *Cellular Microbiology* 21 (5): e13018. <https://doi.org/10.1111/cmi.13018>.
- Dubremetz Jean François. 1998. « Host Cell Invasion by *Toxoplasma gondii* ». *Trends in Microbiology* 6 (1): 27-30. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01165-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01165-7).
- Dzierszynski Florence, Manami Nishi, Lillian Ouko, et David S. Roos. 2004. « Dynamics of *Toxoplasma gondii* Differentiation ». *Eukaryotic Cell* 3 (4): 992-1003. <https://doi.org/10.1128/EC.3.4.992-1003.2004>.
- Ehrenman Karen, Alfica Sehgal, Bao Lige, Timothy T. Stedman, Keith A. Joiner, et Isabelle Coppens. 2010. « Novel Roles for ATP-Binding Cassette G Transporters in Lipid Redistribution in *Toxoplasma* ». *Molecular Microbiology* 76 (5): 1232-49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07169.x>.
- El Hajj Hiba, Maryse Lebrun, Stefan T Arold, Henri Vial, Gilles Labesse, et Jean François Dubremetz. 2007. « ROP18 Is a Rhoptry Kinase Controlling the Intracellular Proliferation of *Toxoplasma gondii* ». Édité par Kasturi Haldar. *PLoS Pathogens* 3 (2): e14. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030014>.
- Elsheikha Hany M., David W. Lacher, et Linda S. Mansfield. 2005. « Phylogenetic Relationships of Sarcocystis Neurona of Horses and Opossums to Other Cyst-Forming Coccidia Deduced from SSU rRNA Gene Sequences ». *Parasitology Research* 97 (5): 345-57. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1396-5>.
- Fagone Paolo, et Suzanne Jackowski. 2009. « Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function ». *Journal of Lipid Research* 50 (Suppl): S311-16. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800049-JLR200>.
- Farrell Andrew, Sivasakthivel Thirugnanam, Alexander Lorestani, Jeffrey D. Dvorin, Keith P. Eidell, David J.P. Ferguson, Brooke R. Anderson-White, Manoj T. Duraisingh, Gabor T. Marth, et Marc-Jan Gubbels. 2012. « A DOC2 Protein Identified by Mutational Profiling is Essential for Apicomplexan Parasite Exocytosis ». *Science (New York, N.y.)* 335 (6065): 218-21. <https://doi.org/10.1126/science.1210829>.

- Fast Naomi M., Lingru Xue, Scott Bingham, et Patrick J. Keeling. 2002. « Re-Examining Alveolate Evolution Using Multiple Protein Molecular Phylogenies ». *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 49 (1): 30-37. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2002.tb00336.x>.
- Fath Stephan, Joseph D. Mancias, Xiping Bi, et Jonathan Goldberg. 2007. « Structure and Organization of Coat Proteins in the COPII Cage ». *Cell* 129 (7): 1325-36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.036>.
- Fellows Justin D., Michael J. Cipriano, Swati Agrawal, et Boris Striepen. 2017. « A Plastid Protein That Evolved from Ubiquitin and Is Required for Apicoplast Protein Import in *Toxoplasma gondii* ». Édité par Louis M. Weiss. *MBio* 8 (3): e00950-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00950-17>.
- Fischer Hans-Georg, Stefan Stachelhaus, Monika Sahm, Helmut E Meyer, et Gaby Reichmann. 1998. « GRA7, an Excretory 29 KDa *Toxoplasma gondii* Dense Granule Antigen Released by Infected Host Cells1Note: Nucleotide Sequence Data Reported in This Paper Are Available in the EMBL, GenBank™ and DDJB Databases under the Accession Number Y13863.1 ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 91 (2): 251-62. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00227-2](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00227-2).
- Florens Laurence, Michael P. Washburn, J. Dale Raine, Robert M. Anthony, Munira Grainger, J. David Haynes, J. Kathleen Moch, et al. 2002. « A Proteomic View of the *Plasmodium falciparum* Life Cycle ». *Nature* 419 (6906): 520-26. <https://doi.org/10.1038/nature01107>.
- Foussard F., M. A. Leriche, et J. F. Dubremetz. 1991. « Characterization of the Lipid Content of *Toxoplasma gondii* Rhoptries ». *Parasitology* 102 Pt 3 (juin): 367-70. <https://doi.org/10.1017/s0031182000064313>.
- Fox Barbara A., Jason P. Gigley, et David J. Bzik. 2004. « *Toxoplasma Gondii* Lacks the Enzymes Required for de Novo Arginine Biosynthesis and Arginine Starvation Triggers Cyst Formation ». *International Journal for Parasitology, The Seventh International Congress on Toxoplasmosis*, 34 (3): 323-31. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.001>.
- Fox Barbara A., Rebekah B. Guevara, Leah M. Rommereim, Alejandra Falla, Valeria Bellini, Graciane Pètre, Camille Rak, et al. 2019. « *Toxoplasma gondii* Parasitophorous Vacuole Membrane-Associated dense granule Proteins Orchestrate Chronic Infection and GRA12 Underpins Resistance to Host Gamma Interferon ». Édité par Louis M. Weiss.

MBio 10 (4): e00589-19, /mbio/10/4/mBio.00589-19.atom.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00589-19>.

- Fox Barbara A., Leah M. Rommereim, Rebekah B. Guevara, Alejandra Falla, Miryam Andrea Hortua Triana, Yanbo Sun, et David J. Bzik. 2016. « The *Toxoplasma gondii* rhoptry kinome is essential for chronic infection ». *MBio* 7 (3): e00193-16.
- Frénal Karine, Valérie Polonais, Jean-Baptiste Marq, Rolf Stratmann, Julien Limenitakis, et Dominique Soldati-Favre. 2010. « Functional Dissection of the *Apicomplexan* Glideosome Molecular Architecture ». *Cell Host & Microbe* 8 (4): 343-57. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.09.002>.
- Fricker-Hidalgo H. B. Cimon, C. Chemla, M. L. Darde, L. Delhaes, C. L'Ollivier, N. Godineau, et al. 2013. « *Toxoplasma* Seroconversion with Negative or Transient Immunoglobulin M in Pregnant Women: Myth or Reality? A French Multicenter Retrospective Study ». *Journal of Clinical Microbiology* 51 (7): 2103-11. <https://doi.org/10.1128/JCM.00169-13>.
- Froissard Marine, Anne-Marie Keller, Jean-Claude Dedieu, et Jean Cohen. 2004. « Novel Secretory Vesicle Proteins Essential for Membrane Fusion Display Extracellular-Matrix Domains: Extracellular-Matrix-Like Proteins in Membrane Fusion ». *Traffic* 5 (7): 493-502. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00194.x>.
- Füßy Zoltán, et Miroslav Oborník. 2017. « Reductive Evolution of *Apicomplexan* Parasites from Phototrophic Ancestors ». In *Evolutionary Biology: Self/Nonsel Evolution, Species and Complex Traits Evolution, Methods and Concepts*, édité par Pierre Pontarotti, 217-36. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61569-1_12.
- Gaddi Pamela J, et George S Yap. 2007. « Cytokine Regulation of Immunopathology in Toxoplasmosis ». *Immunology & Cell Biology* 85 (2): 155-59. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100038>.
- Gagliuso D J, S A Teich, A H Friedman, et J Orellana. 1990. « Ocular toxoplasmosis in AIDS patients. » *Transactions of the American Ophthalmological Society* 88: 63-88.
- Gaji Rajshekhar Y., Halley P. Flammer, et 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>.

- Gardner Malcolm J., Neil Hall, Eula Fung, Owen White, Matthew Berriman, Richard W. Hyman, Jane M. Carlton, et al. 2002. « Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* ». *Nature* 419 (6906). <https://doi.org/10.1038/nature01097>.
- Gardocki Mary E., Niketa Jani, et John M. Lopes. 2005. « Phosphatidylinositol Biosynthesis: Biochemistry and Regulation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1735 (2): 89-100. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.05.006>.
- Gaskins Elizabeth, Stacey Gilk, Nicolette DeVore, Tara Mann, Gary Ward, et Con Beckers. 2004. « Identification of the Membrane Receptor of a Class XIV Myosin in *Toxoplasma gondii* ». *Journal of Cell Biology* 165 (3): 383-93. <https://doi.org/10.1083/jcb.200311137>.
- Gay Gabrielle, Laurence Braun, Marie-Pierre Brenier-Pinchart, Julien Vollaire, Véronique Josserand, Rose-Laurence Bertini, Aurélie Varesano, Bastien Touquet, Pieter-Jan De Bock, et Yohann Coute. 2016. « *Toxoplasma gondii* TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN- γ -mediated host defenses ». *Journal of Experimental Medicine* 213 (9): 1779-98.
- Gilbert Luke A., Sandeep Ravindran, Jay M. Turetzky, John C. Boothroyd, et Peter J. Bradley. 2007. « *Toxoplasma gondii* Targets a Protein Phosphatase 2C to the Nuclei of Infected Host Cells ». *Eukaryotic Cell* 6 (1): 73-83. <https://doi.org/10.1128/EC.00309-06>.
- Gokool Suzanne, Daniel Tattersall, Jonathan V. Reddy, et Matthew NJ Seaman. 2007. « Identification of a conserved motif required for Vps35p/Vps26p interaction and assembly of the retromer complex ». *Biochemical journal* 408 (2): 287-95.
- Gold Daniel A, Aaron D Kaplan, Agnieszka Lis, Glenna CL Bett, Emily E Rosowski, Kimberly M Cirelli, Alexandre Bougdour, et al. 2015a. « The *Toxoplasma* dense granule proteins GRA17 and GRA23 mediate the movement of small molecules between the host and the parasitophorous vacuole ». *Cell host & microbe* 17 (5): 642-52. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.003>.
- Gold Daniel A., Aaron D. Kaplan, Agnieszka Lis, Glenna C. L. Bett, Emily E. Rosowski, Kimberly M. Cirelli, Alexandre Bougdour, et al. 2015b. « The *Toxoplasma* dense granule Proteins GRA17 and GRA23 Mediate the Movement of Small Molecules between the Host and the Parasitophorous Vacuole ». *Cell Host & Microbe* 17 (5): 642-52. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.003>.
- Golding Hana, Julio Aliberti, Lisa R. King, Jody Manischewitz, John Andersen, Jesus Valenzuela, Nathaniel R. Landau, et Alan Sher. 2003. « Inhibition of HIV-1 infection by a CCR5-binding cyclophilin from *Toxoplasma gondii* ». *Blood* 102 (9): 3280-86.

- Goldstein Ellie J. C., Jose G. Montoya, et Jack S. Remington. 2008. « Management of *Toxoplasma gondii* Infection during Pregnancy ». *Clinical Infectious Diseases* 47 (4): 554-66. <https://doi.org/10.1086/590149>.
- Gordon Jennifer L., Wandy L. Beatty, et L. David Sibley. 2008. « A Novel Actin-Related Protein Is Associated with Daughter Cell Formation in *Toxoplasma gondii* ». *Eukaryotic Cell* 7 (9): 1500-1512. <https://doi.org/10.1128/EC.00064-08>.
- Graindorge Arnault, Karine Frénel, Damien Jacot, Julien Salamun, Jean Baptiste Marq, et Dominique Soldati-Favre. 2016. « The Conoid Associated Motor MyoH Is Indispensable for *Toxoplasma gondii* Entry and Exit from Host Cells ». *PLOS Pathogens* 12 (1): e1005388. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005388>.
- Griffith Michael B., Camille S. Pearce, et Aoife T. Heaslip. 2022. « Dense Granule Biogenesis, Secretion, and Function in *Toxoplasma gondii* ». *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, mars, e12904. <https://doi.org/10.1111/jeu.12904>.
- Gross U., et F. Pohl. 1996. « Influence of Antimicrobial Agents on Replication and Stage Conversion of *Toxoplasma gondii* ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 219: 235-45. https://doi.org/10.1007/978-3-642-51014-4_21.
- Gubbels Marc-Jan, et Manoj T. Duraisingh. 2012. « Evolution of apicomplexan secretory organelles ». *International journal for parasitology* 42 (12): 1071-81. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.009>.
- Gupta Nishith, Anne Hartmann, Richard Lucius, et Dennis R. Voelker. 2012. « The Obligate Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii* Secretes a Soluble Phosphatidylserine Decarboxylase ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (27): 22938-47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.373639>.
- Gupta Nishith, Matthew M. Zahn, Isabelle Coppens, Keith A. Joiner, et Dennis R. Voelker. 2005. « Selective Disruption of Phosphatidylcholine Metabolism of the Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii* Arrests Its Growth* ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (16): 16345-53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501523200>.
- Habermann Bianca. 2004. « The BAR-domain Family of Proteins: A Case of Bending and Binding?: The Membrane Bending and GTPase-binding Functions of Proteins from the BAR-domain Family ». *EMBO Reports* 5 (3): 250-55. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400105>.
- Hajj Hiba El, Maryse Lebrun, Marie Noëlle Fourmaux, Henri Vial, et Jean François Dubremetz. 2007. « Inverted Topology of the *Toxoplasma gondii* ROP5 Rhoptry Protein Provides New Insights into the Association of the ROP2 Protein Family with the Parasitophorous

- Vacuole Membrane ». *Cellular Microbiology* 9 (1): 54-64.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00767.x>.
- Hakimi Mohamed-Ali, Philipp Olias, et 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>.
- Haldar Kasturi. 2016. « Protein Trafficking in *Apicomplexan* Parasites: Crossing the Vacuolar Rubicon ». *Current Opinion in Microbiology* 32 (août): 38-45.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.013>.
- Hallée Stéphanie, Justin A. Boddey, Alan F. Cowman, et Dave Richard. 2018. « 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 (1): e00551-17.
- Hallée Stéphanie, Natalie A. Counihan, Kathryn Matthews, Tania F. de Koning-Ward, et Dave Richard. 2018a. « 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>.
- Hammoudi Pierre-Mehdi, Damien Jacot, Christina Mueller, Manlio Di Cristina, Sunil Kumar Dogga, Jean-Baptiste Marq, Julia Romano, et al. 2015. « Fundamental Roles of the Golgi-Associated *Toxoplasma* Aspartyl Protease, ASP5, at the Host-Parasite Interface ». *PLOS Pathogens* 11 (10): e1005211.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005211>.
- Hammoudi Pierre-Mehdi, Bohumil Maco, Sunil Kumar Dogga, Karine Frénel, et Dominique Soldati-Favre. 2018. « *Toxoplasma gondii* TFP1 Is an Essential Transporter Family Protein Critical for Microneme Maturation and Exocytosis ». *Molecular Microbiology* 109 (2): 225-44. <https://doi.org/10.1111/mmi.13981>.
- Hanks Steven K., et Tony Hunter. 1995. « The Eukaryotic Protein Kinase Superfamily: Kinase (Catalytic) Domain Structure and Classification1 ». *The FASEB Journal* 9 (8): 576-96.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.9.8.7768349>.
- Harding Clare R., et Markus Meissner. 2014. « The inner membrane complex through development of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* ». *Cellular microbiology* 16 (5): 632-41.
- Harper, Jill M., My-Hang Huynh, Isabelle Coppens, Fabiola Parussini, Silvia Moreno, et Vern B. Carruthers. 2006. « A Cleavable Propeptide Influences *Toxoplasma* Infection by Facilitating the Trafficking and Secretion of the TgMIC2–M2AP Invasion Complex ».

- Molecular Biology of the Cell* 17 (10): 4551-63. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-01-0064>.
- Harper Thomas W., Darlene Miller, Joyce C. Schiffman, et Janet L. Davis. 2009. « Polymerase Chain Reaction Analysis of Aqueous and Vitreous Specimens in the Diagnosis of Posterior Segment Infectious Uveitis ». *American Journal of Ophthalmology* 147 (1): 140-147.e2. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2008.07.043>.
- Harrison Megan S., Chia-Sui Hung, Ting-ting Liu, Romain Christiano, Tobias C. Walther, et Christopher G. Burd. 2014. « A Mechanism for Retromer Endosomal Coat Complex Assembly with Cargo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (1): 267-72. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316482111>.
- Hartmann Anne, Maria Hellmund, Richard Lucius, Dennis R. Voelker, et Nishith Gupta. 2014. « Phosphatidylethanolamine Synthesis in the Parasite Mitochondrion Is Required for Efficient Growth but Dispensable for Survival of *Toxoplasma gondii** ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (10): 6809-24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.509406>.
- He Huan, Marie-Pierre Brenier-Pinchart, Laurence Braun, Alexandra Kraut, Bastien Touquet, Yohann Coute, Isabelle Tardieux, Mohamed-Ali Hakimi, et Alexandre Bougdour. 2018. « Characterization of a *Toxoplasma* effector uncovers an alternative GSK3/ β -catenin-regulatory pathway of inflammation ». *Elife* 7.
- Heaslip Aoife T., Stephanie C. Ems-McClung, et Ke Hu. 2009. « TgICMAP1 Is a Novel Microtubule Binding Protein in *Toxoplasma gondii* ». *PLOS ONE* 4 (10): e7406. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007406>.
- Heaslip Aoife T., Shane R. Nelson, et David M. Warshaw. 2016. « Dense granule trafficking in *Toxoplasma gondii* requires a unique class 27 myosin and actin filaments ». *Molecular Biology of the Cell* 27 (13): 2080-89. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-12-0824>.
- Heijne Gunnar von. 2006. « Membrane-Protein Topology ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (12): 909-18. <https://doi.org/10.1038/nrm2063>.
- Henkel Stephanie, Nora Frohnecke, Deborah Maus, Malcolm J. McConville, Michael Laue, Martin Blume, et Frank Seeber. 2022. « *Toxoplasma gondii* Apicoplast-Resident Ferredoxin Is an Essential Electron Transfer Protein for the MEP Isoprenoid-Biosynthetic Pathway ». *Journal of Biological Chemistry* 298 (1). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101468>.
- Herdero-Bermejo Irene, Joseph M. Varberg, Robert Charvat, Kylie Jacobs, Tamila Garbuz, William J. Sullivan, et Gustavo Arrizabalaga. 2019. « TgDrpC, an atypical dynamin-

- related protein in *Toxoplasma gondii*, is associated with vesicular transport factors and parasite division ». *Molecular microbiology* 111 (1): 46-64. <https://doi.org/10.1111/mmi.14138>.
- Hermey Guido. 2009. « The Vps10p-domain receptor family ». *Cellular and molecular life sciences* 66 (16): 2677-89.
- Herm-Götz Angelika, Stefan Weiss, Rolf Stratmann, Setsuko Fujita-Becker, Christine Ruff, Edgar Meyhöfer, Thierry Soldati, Dietmar J. Manstein, Michael A. Geeves, et Dominique Soldati. 2002. « *Toxoplasma gondii* myosin A and its light chain: a fast, single-headed, plus-end-directed motor ». *The EMBO Journal* 21 (9): 2149-58. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.9.2149>.
- Hill Ross J., Alessa Ringel, Ellen Knuepfer, Robert W. Moon, Michael J. Blackman, et Christiaan van Ooij. 2016. « Regulation and Essentiality of the StAR-related Lipid Transfer (START) Domain-containing Phospholipid Transfer Protein PFA0210c in Malaria Parasites ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (46): 24280-92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.740506>.
- Himangshu S. Bose, *, § Randy M. Whittal, ‡ Yong Ran, ‡ Mahuya Bose, | and Bo Y. Baker, et Walter L. Miller. 2008. « StAR-like Activity and Molten Globule Behavior of StARD6, A Male Germ-Line Protein† ». Research-article. American Chemical Society. World. 23 janvier 2008. <https://doi.org/10.1021/bi701966a>.
- Hoppe Heinrich C., et Keith A. Joiner. 2000. « Cytoplasmic Tail Motifs Mediate Endoplasmic Reticulum Localization and Export of Transmembrane Reporters in the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii* ». *Cellular Microbiology* 2 (6): 569-78. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2000.00081.x>.
- Hoppe Heinrich C., Huân M. Ngô, Mei Yang, et Keith A. Joiner. 2000. « Targeting to Rhoptry Organelles of *Toxoplasma gondii* Involves Evolutionarily Conserved Mechanisms. » *Nature Cell Biology* 2 (7): 449-56. <https://doi.org/10.1038/35017090>.
- Horibata Yasuhiro, et Hiroyuki Sugimoto. 2010. « StarD7 Mediates the Intracellular Trafficking of Phosphatidylcholine to Mitochondria ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (10): 7358-65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.056960>.
- Hsu Victor W., Stella Y. Lee, et Jia-Shu Yang. 2009. « The evolving understanding of COPI vesicle formation ». *Nature reviews Molecular cell biology* 10 (5): 360-64.
- Hu Ke, Jeff Johnson, Laurence Florens, Martin Fraunholz, Sapna Suravajjala, Camille DiLullo, John Yates, David S. Roos, et John M. Murray. 2006. « 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>.
- Hu Ke, Tara Mann, Boris Striepen, Con J. M. Beckers, David S. Roos, et John M. Murray. 2002. « Daughter Cell Assembly in the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii* ». Édité par Jennifer Lippincott-Schwartz. *Molecular Biology of the Cell* 13 (2): 593-606. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-06-0309>.
- Hu Ke, David S. Roos, et John M. Murray. 2002. « A Novel Polymer of Tubulin Forms the Conoid of *Toxoplasma gondii* ». *Journal of Cell Biology* 156 (6): 1039-50. <https://doi.org/10.1083/jcb.200112086>.
- Hu Xiaoyu, Derk Binns, et Michael L. Reese. 2017. « The coccidian parasites *Toxoplasma* and *Neospora* dysregulate mammalian lipid droplet biogenesis ». *Journal of Biological Chemistry* 292 (26): 11009-20.
- Hughes Helen, et David J. Stephens. 2008. « Assembly, Organization, and Function of the COPII Coat ». *Histochemistry and Cell Biology* 129 (2): 129-51. <https://doi.org/10.1007/s00418-007-0363-x>.
- Hunter Christopher A., et L. David Sibley. 2012. « Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors ». *Nature reviews. Microbiology* 10 (11): 766-78. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2858>.
- Huotari Jatta, et Ari Helenius. 2011. « Endosome maturation ». *The EMBO journal* 30 (17): 3481-3500.
- Huynh My-Hang, et Vern B. Carruthers. 2006a. « *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence ». *PLoS pathogens* 2 (8): e84.
- Huynh My-Hang, et Vern B Carruthers. 2006b. « *Toxoplasma* MIC2 Is a Major Determinant of Invasion and Virulence ». *PLoS Pathogens* 2 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020084>.
- Huynh My-Hang, et Vern B. Carruthers. 2009. « Tagging of Endogenous Genes in a *Toxoplasma gondii* Strain Lacking Ku80 ». *Eukaryotic Cell* 8 (4): 530-39. <https://doi.org/10.1128/EC.00358-08>.
- Huynh My-Hang, Karen E. Rabenau, Jill M. Harper, Wandy L. Beatty, L. David Sibley, et Vern B. Carruthers. 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>.
- Inácio Sandra Valéria, Giovanni Widmer, Roberta Lomonte Lemos de Brito, Anaiza Simão Zucatto, Monally Conceição Costa de Aquino, Bruno César Miranda Oliveira, Alex

- Akira Nakamura, et al. 2017. « First Description of *Cryptosporidium hominis* GP60 Genotype IkA20G1 and *Cryptosporidium parvum* GP60 Genotypes IlaA18G3R1 and IlaA15G2R1 in Foals in Brazil ». *Veterinary Parasitology* 233 (janvier): 48-51. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.11.021>.
- Iyer Lakshminarayan M., Eugene V. Koonin, et L. Aravind. 2001. « Adaptations of the Helix-Grip Fold for Ligand Binding and Catalysis in the START Domain Superfamily ». *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 43 (2): 134-44. [https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20010501\)43:2<134::AID-PROT1025>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20010501)43:2<134::AID-PROT1025>3.0.CO;2-I).
- Jan Calvin H., Christopher C. Williams, et Jonathan S. Weissman. 2014. « Principles of ER Cotranslational Translocation Revealed by Proximity-Specific Ribosome Profiling ». *Science* 346 (6210): 1257521. <https://doi.org/10.1126/science.1257521>.
- Janouškovec Jan, Gita G Paskerova, Tatiana S Miroljubova, Kirill V Mikhailov, Thomas Birley, Vladimir V Aleoshin, et Timur G Simdyanov. 2019. « Apicomplexan-like parasites are polyphyletic and widely but selectively dependent on cryptic plastid organelles ». Édité par John McCutcheon, Detlef Weigel, Christopher Howe, et Geoff McFadden. *eLife* 8 (août): e49662. <https://doi.org/10.7554/eLife.49662>.
- Jean Steve, Sarah Cox, Eric J. Schmidt, Fred L. Robinson, et Amy Kiger. 2012. « Sbf/MTMR13 coordinates PI(3)P and Rab21 regulation in endocytic control of cellular remodeling ». *Molecular Biology of the Cell* 23 (14): 2723-40. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-05-0375>.
- Jewett Travis J., et L. David Sibley. 2003. « Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in *Apicomplexan* parasites ». *Molecular cell* 11 (4): 885-94.
- Jh Morisaki, Heuser Je, et Sibley Ld. 1995. « Invasion of *Toxoplasma gondii* Occurs by Active Penetration of the Host Cell ». *Journal of Cell Science* 108 (Pt 6) (juin). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7673360/>.
- Jimenez-Ruiz, Elena, Juliette Morlon-Guyot, Wassim Daher, et 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>.
- Johannes Ludger, et Vincent Popoff. 2008. « Tracing the Retrograde Route in Protein Trafficking ». *Cell* 135 (7): 1175-87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.009>.
- Johannes Ludger, et Christian Wunder. 2011. « Retrograde transport: two (or more) roads diverged in an endosomal tree? » *Traffic* 12 (8): 956-62.

- Johnson Terezina M., Zenon Rajfur, Ken Jacobson, et Con J. Beckers. 2007. « Immobilization of the type XIV myosin complex in *Toxoplasma gondii* ». *Molecular biology of the cell* 18 (8): 3039-46.
- Jones L. A., J. Alexander, et C. W. Roberts. 2006. « Ocular Toxoplasmosis: In the Storm of the Eye ». *Parasite Immunology* 28 (12): 635-42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00874.x>.
- Jones Leigh, James Alexander, et Craig Roberts. 2007. « Ocular toxoplasmosis: In the storm of the eye ». *Parasite immunology* 28 (janvier): 635-42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00874.x>.
- Jones Matthew L., Chris Cottingham, et Julian C. Rayner. 2009. « Effects of Calcium Signaling on *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Invasion and Post-translational Modification of Gliding-Associated Protein 45 (PfGAP45) ». *Molecular and biochemical parasitology* 168 (1): 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.06.007>.
- Kalanon Ming, et Geoffrey I. McFadden. 2010. « Malaria, *Plasmodium falciparum* and Its Apicoplast ». *Biochemical Society Transactions* 38 (3): 775-82. <https://doi.org/10.1042/BST0380775>.
- Kang Hye Won, Jie Wei, et David E. Cohen. 2010. « Regulation of Lipid and Glucose Metabolism by Phosphatidylcholine Transfer Protein ». *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 21 (7): 449-56. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.02.001>.
- Katris Nicholas J., Huiling Ke, Geoffrey I. McFadden, Giel G. van Dooren, et Ross F. Waller. 2019. « Calcium Negatively Regulates Secretion from Dense Granules in *Toxoplasma gondii* ». *Cellular Microbiology* 21 (6): e13011. <https://doi.org/10.1111/cmi.13011>.
- Kawase Osamu, Yoshifumi Nishikawa, Hiroshi Bannai, Houshuang Zhang, Guohong Zhang, Shigeki Jin, Eung-Goo Lee, et Xuenan Xuan. 2007. « Proteomic Analysis of Calcium-Dependent Secretion in *Toxoplasma gondii* ». *Proteomics* 7 (20): 3718-25. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700362>.
- Keeley Anthony et Dominique Soldati. 2004. « The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by *Apicomplexa* ». *Trends in cell biology* 14 (10): 528-32.
- Kessler H., A. Herm-Gotz, S. Hegge, M. Rauch, D. Soldati-Favre, F. Frischknecht, et M. 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>.

- Kibria K. M. Kaderi, Jannatul Ferdous, Rahila Sardar, Ashutosh Panda, Dinesh Gupta, Asif Mohmmmed, et Pawan Malhotra. 2019. « A genome-wide analysis of coatomer protein (COP) subunits of *Apicomplexan* parasites and their evolutionary relationships ». *BMC Genomics* 20 (1): 98. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5463-1>.
- Kim Kami, et 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>.
- Kim Seon-Kyeong, Ashley E. Fouts, et John C. Boothroyd. 2007. « *Toxoplasma gondii* dysregulates IFN- γ -inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling ». *The Journal of Immunology* 178 (8): 5154-65.
- Kim Soo-A, Panayiotis O. Vacratsis, Ron Firestein, Michael L. Cleary, et Jack E. Dixon. 2003. « Regulation of myotubularin-related (MTMR)2 phosphatidylinositol phosphatase by MTMR5, a catalytically inactive phosphatase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (8): 4492-97. <https://doi.org/10.1073/pnas.0431052100>.
- Klinger Stine C., Piotr Siupka, et Morten S. Nielsen. 2015. « Retromer-Mediated Trafficking of Transmembrane Receptors and Transporters ». *Membranes* 5 (3): 288-306. <https://doi.org/10.3390/membranes5030288>.
- Kochanowsky Joshua A., et Anita A. Koshy. 2018. « *Toxoplasma gondii* ». *Current Biology* 28 (14): R770-71. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.035>.
- Koike Seiichi, et Reinhard Jahn. 2019. « SNAREs Define Targeting Specificity of Trafficking Vesicles by Combinatorial Interaction with Tethering Factors ». *Nature Communications* 10 (1): 1608. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09617-9>.
- Kong Pengfei, Christoph-Martin Ufermann, Diana L. M. Zimmermann, Qing Yin, Xun Suo, J. Bernd Helms, Jos F. Brouwers, et Nishith Gupta. 2017. « Two phylogenetically and compartmentally distinct CDP-diacylglycerol synthases cooperate for lipid biogenesis in *Toxoplasma gondii* ». *The Journal of Biological Chemistry* 292 (17): 7145-59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.765487>.
- Kostopoulou D. S. Casaert, N. Tzanidakis, D. van Doorn, J. Demeler, G. von Samson-Himmelstjerna, A. Saratsis, et al. 2015. « The Occurrence and Genetic Characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* Species in Foals in Belgium, The Netherlands, Germany and Greece ». *Veterinary Parasitology* 211 (3): 170-74. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.018>.
- Kotloff Karen L, James P Nataro, William C Blackwelder, Dilruba Nasrin, Tamer H Farag, Sandra Panchalingam, Yukun Wu, et al. 2013. « Burden and Aetiology of Diarrhoeal

- Disease in Infants and Young Children in Developing Countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A Prospective, Case-Control Study ». *The Lancet* 382 (9888): 209-22. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60844-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60844-2).
- Kotresha Dupadahalli et Rahmah Noordin. 2010. « Recombinant Proteins in the Diagnosis of Toxoplasmosis ». *APMIS* 118 (8): 529-42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.02629.x>.
- Kravetz Jeffrey D. et Daniel G. Federman. 2005. « Toxoplasmosis in Pregnancy ». *The American Journal of Medicine* 118 (3): 212-16. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2004.08.023>.
- 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 ». *PLOS Pathogens* 9 (3): 16.
- Kumagai Keigo, Satoshi Yasuda, Kazuo Okemoto, Masahiro Nishijima, Shu Kobayashi, et Kentaro Hanada. 2005. « CERT Mediates Intermembrane Transfer of Various Molecular Species of Ceramides* ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (8): 6488-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409290200>.
- Kumar Sah, Raj, Swati Garg, Poonam Dangi, Kalaiarasan Ponnusamy, et Shailja Singh. 2019. « Phosphatidic Acid Homeostasis Regulated by a Type-2 Phosphatidic Acid Phosphatase Represents a Novel Druggable Target in Malaria Intervention ». *Cell Death Discovery* 5 (1): 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0187-1>.
- Lamarque Mauld, Sébastien Besteiro, Julien Papoin, Magali Roques, Brigitte Vulliez-Le Normand, Juliette Morlon-Guyot, Jean-François Dubremetz, et al. 2011. « The RON2-AMA1 Interaction Is a Critical Step in Moving Junction-Dependent Invasion by *Apicomplexan* Parasites ». Édité par Dominique Soldati-Favre. *PLoS Pathogens* 7 (2): e1001276. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001276>.
- Lebrun Maryse, Adeline Michelin, Hiba El Hajj, Joël Poncet, Peter J. Bradley, Henri Vial, et Jean François Dubremetz. 2005. « The Rhoptry Neck Protein RON4 Relocalizes at the Moving Junction during *Toxoplasma gondii* Invasion ». *Cellular Microbiology* 7 (12): 1823-33. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00646.x>.
- Lebrun Maryse, Adeline Michelin, Hiba El Hajj, Joël Poncet, Peter J. Bradley, Henri Vial, et Jean François Dubremetz. 2005. « The Rhoptry Neck Protein RON4 Relocalizes at the Moving Junction during *Toxoplasma gondii* Invasion ». *Cellular Microbiology* 7 (12): 1823-33. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00646.x>.

- Lekutis Christine, David J.P. Ferguson, Michael E. Grigg, Manel Camps, et John C. Boothroyd. 2001. « Surface Antigens of *Toxoplasma gondii*: Variations on a Theme ». *International Journal for Parasitology* 31 (12): 1285-92. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00261-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00261-2).
- Lenoir Marc, Irina Kufareva, Ruben Abagyan, et Michael Overduin. 2015. « Membrane and Protein Interactions of the Pleckstrin Homology Domain Superfamily ». *Membranes* 5 (4): 646-63. <https://doi.org/10.3390/membranes5040646>.
- Lentini Gaelle, Marie Kong-Hap, Hiba El Hajj, Maria Francia, Cyrille Claudet, Boris Striepen, Jean-François Dubremetz, et Maryse Lebrun. 2015. « Identification and characterization of *Toxoplasma* SIP, a conserved *Apicomplexan* cytoskeleton protein involved in maintaining the shape, motility and virulence of the parasite ». *Cellular microbiology* 17 (1): 62-78. <https://doi.org/10.1111/cmi.12337>.
- Letourneau Danny, Andrée Lefebvre, Pierre Lavigne, et Jean-Guy Lehoux. 2013. « STARD5 specific ligand binding: comparison with STARD1 and STARD4 subfamilies ». *Molecular and cellular endocrinology* 371 (janvier). <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.01.004>.
- Lev Sima. 2010. « Non-Vesicular Lipid Transport by Lipid-Transfer Proteins and Beyond ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (10): 739-50. <https://doi.org/10.1038/nrm2971>.
- Leykauf Kerstin, Moritz Treeck, Paul R. Gilson, Thomas Nebl, Thomas Braulke, Alan F. Cowman, Tim W. Gilberger, et Brendan S. Crabb. 2010. « Protein Kinase A Dependent Phosphorylation of Apical Membrane Antigen 1 Plays an Important Role in Erythrocyte Invasion by the Malaria Parasite ». Édité par Kami Kim. *PLoS Pathogens* 6 (6): e1000941. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000941>.
- Li Jian, Peter J. Peters, Ming Bai, Jun Dai, Erik Bos, Tomas Kirchhausen, Konstantin V. Kandror, et Victor W. Hsu. 2007. « An ACAP1-containing clathrin coat complex for endocytic recycling ». *The Journal of cell biology* 178 (3): 453-64.
- Liendo Andreina, Timothy T. Stedman, Huân M. Ngô, Sudha Chaturvedi, Heinrich C. Hoppe, et Keith A. Joiner. 2001. « *Toxoplasma gondii* ADP-Ribosylation Factor 1 Mediates Enhanced Release of Constitutively Secreted Dense Granule Proteins * ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (21): 18272-81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008352200>.
- Lima Tatiane S., Lanny Gov, et Melissa B. Lodoen. 2018. « Evasion of human neutrophil-mediated host defense during *Toxoplasma gondii* infection ». *MBio* 9 (1): e02027-17.

- Lima Tatiane S. et Melissa B. Lodoen. 2019. « Mechanisms of human innate immune evasion by *Toxoplasma gondii* ». *Frontiers in cellular and infection microbiology* 9: 103.
- Long Shaojun, Kevin M. Brown, Lisa L. Drewry, Bryan Anthony, Isabelle Q. H. Phan, et L. David Sibley. 2017. « Calmodulin-like Proteins Localized to the Conoid Regulate Motility and Cell Invasion by *Toxoplasma gondii* ». *PLOS Pathogens* 13 (5): e1006379. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006379>.
- Lopes Fabiana Maria Ruiz, Daniela Dib Gonçalves, Regina Mitsuka-Breganó, Roberta Lemos Freire, et Itamar Teodorico Navarro. 2007. « *Toxoplasma gondii* Infection in Pregnancy ». *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 11 (octobre): 496-506. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702007000500011>.
- Lopez-Perez Mary, M. Andreína Pacheco, Lucía Buriticá, Ananias A. Escalante, Sócrates Herrera, et Myriam Arévalo-Herrera. 2016. « Malaria in Pregnancy: A Passive Surveillance Study of Pregnant Women in Low Transmission Areas of Colombia, Latin America ». *Malaria Journal* 15 (1): 66. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1125-9>.
- Lyons Russell E, Rima McLeod, et Craig W Roberts. 2002. « *Toxoplasma gondii* Tachyzoite-Bradyzoite Interconversion ». *Trends in Parasitology* 18 (5): 198-201. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02248-1](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02248-1).
- Ma Ji Su, Miwa Sasai, Jun Ohshima, Youngae Lee, Hironori Bando, Kiyoshi Takeda, et Masahiro Yamamoto. 2014. « Selective and strain-specific NFAT4 activation by the *Toxoplasma gondii* polymorphic dense granule protein GRA6 ». *Journal of Experimental Medicine* 211 (10): 2013-32. <https://doi.org/10.1084/jem.20131272>.
- MacMicking John D. 2012. « Interferon-Inducible Effector Mechanisms in Cell-Autonomous Immunity ». *Nature Reviews Immunology* 12 (5): 367-82. <https://doi.org/10.1038/nri3210>.
- Mageswaran Shrawan Kumar, Amandine Guérin, Liam M. Theveny, William David Chen, Matthew Martinez, Maryse Lebrun, Boris Striepen, et Yi-Wei Chang. 2021. « In Situ Ultrastructures of Two Evolutionarily Distant Apicomplexan Rhoptry Secretion Systems ». *Nature Communications* 12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25309-9>.
- Magno Rodrigo Cardoso, Lorian Cobra Straker, Wanderley de Souza, et Marcia Attias. 2005. « Interrelations between the Parasitophorous Vacuole of *Toxoplasma gondii* and Host Cell Organelles ». *Microscopy and Microanalysis* 11 (2): 166-74. <https://doi.org/10.1017/S1431927605050129>.
- Manzéger Anna, Kinga Tagscherer, Péter Lőrincz, Henrik Szaker, Tamás Lukácsovich, Petra Pilz, Regina Kméczik, et al. 2021. « Condition-Dependent Functional Shift of Two

- Drosophila* Mtmr Lipid Phosphatases in Autophagy Control ». *Autophagy* 17 (12): 4010-28. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1899681>.
- Marino Nicole D., et John C. Boothroyd. 2017. « *Toxoplasma* Growth in Vitro Is Dependent on Exogenous Tyrosine and Is Independent of AAH2 Even in Tyrosine-Limiting Conditions ». *Experimental Parasitology* 176 (mai): 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.02.018>.
- Martin Thomas F. J. 2015. « PI(4,5)P₂-Binding Effector Proteins for Vesicle Exocytosis ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1851 (6): 785-93. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2014.09.017>.
- Martinez Matthew, William David Chen, Marta Mendonça Cova, Petra Molnár, Shrawan Kumar Mageswaran, Amandine Guérin, Audrey R. Odom John, Maryse Lebrun, et Yi-Wei Chang. 2022. « Rhoptry Secretion System Structure and Priming in *Plasmodium falciparum* Revealed Using in Situ Cryo-Electron Tomography ». *Nature Microbiology* 7 (8): 1230-38. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01171-3>.
- Martins-Duarte Érica S., Maira Carias, Rossiane Vommaro, Namita Surolia, et Wanderley de Souza. 2016. « Apicoplast Fatty Acid Synthesis Is Essential for Pellicle Formation at the End of Cytokinesis in *Toxoplasma gondii* ». *Journal of Cell Science* 129 (17): 3320-31. <https://doi.org/10.1242/jcs.185223>.
- Martins-Duarte Érica S., Lilach Sheiner, Sarah B. Reiff, Wanderley de Souza, et Boris Striepen. 2021. « Replication and Partitioning of the Apicoplast Genome of *Toxoplasma gondii* is Linked to the Cell Cycle and Requires DNA Polymerase and Gyrase ». *International Journal for Parasitology* 51 (6): 493-504. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.11.004>.
- Matthiesen Steen H., Shailesh M. Shenoy, Kami Kim, Robert H. Singer, et Birgit H. Satir. 2001. « A parafusin-related *Toxoplasma* protein in Ca²⁺-regulated secretory organelles ». *European journal of cell biology* 80 (12): 775-83.
- Mayoral, Joshua, Rebekah B. Guevara, Yolanda Rivera-Cuevas, Vincent Tu, Tadakimi Tomita, Julia D. Romano, Leslie Gunther-Cummins, Simone Sidoli, Isabelle Coppens, et Vernon B. Carruthers. 2022. « Dense Granule Protein GRA64 Interacts with Host Cell ESCRT Proteins during *Toxoplasma gondii* Infection ». *Mbio* 13 (4): e01442-22.
- McCaughey, Janine, Nicola L. Stevenson, Stephen Cross, et David J. Stephens. 2018. « ER-to-Golgi trafficking of procollagen in the absence of large carriers ». *Journal of Cell Biology* 218 (3): 929-48. <https://doi.org/10.1083/jcb.201806035>.
- McFadden, Geoffrey Ian. 2011. « The Apicoplast ». *Protoplasma* 248 (4): 641-50. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0250-5>.

- McGovern Olivia L., et 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>.
- McMahon Harvey T., et Ian G. Mills. 2004. « COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches ». *Current opinion in cell biology* 16 (4): 379-91.
- Meissner Markus, Dirk Schlüter, et Dominique Soldati. 2002. « Role of *Toxoplasma gondii* Myosin A in Powering Parasite Gliding and Host Cell Invasion ». *Science* 298 (5594): 837-40. <https://doi.org/10.1126/science.1074553>.
- Melo Mariane B., Kirk D.C. Jensen, et Jeroen P.J. Saeij. 2011. « *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response ». *Trends in parasitology* 27 (11): 487-95. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.08.001>.
- Mercier Corinne, Koku D. Z. Adjogble, Walter Däubener, et Marie-France-Cesbron Delauw. 2005. « Dense Granules: Are They Key Organelles to Help Understand the Parasitophorous Vacuole of All *Apicomplexa* Parasites? » *International Journal for Parasitology* 35 (8): 829-49. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.011>.
- Mercier Corinne et Marie-France Cesbron-Delauw. 2015. « *Toxoplasma* Secretory Granules: One Population or More? » *Trends in Parasitology* 31 (2): 60-71. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.002>.
- Mercier Corinne, Jean-François Dubremetz, Béatrice Rauscher, Laurence Lecordier, L. David Sibley et Marie-France Cesbron-Delauw. 2002. « Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins ». *Molecular biology of the cell* 13 (7): 2397-2409.
- Mets Marilyn Baird et Manpreet Singh Chhabra. 2008. « Eye Manifestations of Intrauterine Infections and Their Impact on Childhood Blindness ». *Survey of Ophthalmology* 53 (2): 95-111. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2007.12.003>.
- Mironov Alexander A. et Galina V. Beznoussenko. 2019. « Models of Intracellular Transport: Pros and Cons ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7 (août): 146. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00146>.
- Mital Jeffrey, Markus Meissner, Dominique Soldati et 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>.

- Moncada Pablo A, et Jose G Montoya. 2012. « Toxoplasmosis in the Fetus and Newborn: An Update on Prevalence, Diagnosis and Treatment ». *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 10 (7): 815-28. <https://doi.org/10.1586/eri.12.58>.
- Montazeri Mahbobeh, Tahereh Mikaeili Galeh, Mahmood Moosazadeh, Shahabeddin Sarvi, Samira Dodangeh, Javad Javidnia, Mehdi Sharif, et Ahmad Daryani. 2020. « The global serological prevalence of *Toxoplasma gondii* in felids during the last five decades (1967–2017): a systematic review and meta-analysis ». *Parasites & Vectors* 13 (1): 82. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3954-1>.
- Montoya J. G. et O. Liesenfeld. 2004. « Toxoplasmosis ». *Lancet (London, England)* 363 (9425): 1965-76. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X).
- Mordue D. G., S. Håkansson, I. Niesman, et L. D. Sibley. 1999. « *Toxoplasma gondii* Resides in a Vacuole That Avoids Fusion with Host Cell Endocytic and Exocytic Vesicular Trafficking Pathways ». *Experimental Parasitology* 92 (2): 87-99. <https://doi.org/10.1006/expr.1999.4412>.
- Mordue D. G. et L. D. Sibley. 1997. « Intracellular Fate of Vacuoles Containing *Toxoplasma gondii* Is Determined at the Time of Formation and Depends on the Mechanism of Entry. » *The Journal of Immunology* 159 (9): 4452-59.
- Morlon-Guyot Juliette, Maria E. Francia, Jean-François Dubremetz et Wassim Daher. 2017. « Towards a Molecular Architecture of the Centrosome in *Toxoplasma gondii* ». *Cytoskeleton* 74 (2): 55-71. <https://doi.org/10.1002/cm.21353>.
- Morlon-Guyot Juliette, Sandra Pastore, Laurence Berry, Maryse Lebrun, et 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.
- Morrisette Naomi S. et L. David Sibley. 2002. « 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>.
- Mueller Christina, Natacha Klages, Damien Jacot, Joana M. Santos, Ana Cabrera, Tim W. Gilberger, Jean-François Dubremetz et Dominique Soldati-Favre. 2013. « The *Toxoplasma* Protein ARO Mediates the Apical Positioning of Rhoptry Organelles, a Prerequisite for Host Cell Invasion ». *Cell Host & Microbe* 13 (3): 289-301. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.02.001>.
- Mueller, Christina, Atta Samoo, Pierre-Mehdi Hammoudi, Natacha Klages, Juha Pekka Kallio, Inari Kursula, et Dominique Soldati-Favre. 2016. « Structural and Functional Dissection

- of *Toxoplasma gondii* Armadillo Repeats Only Protein ». *Journal of Cell Science* 129 (5): 1031-45. <https://doi.org/10.1242/jcs.177386>.
- Mukhopadhyay Debanjan, David Arranz-Solís et Jeroen P. J. Saeij. 2020. « *Toxoplasma* GRA15 and GRA24 are important activators of the host innate immune response in the absence of TLR11 ». *PLoS Pathogens* 16 (5): e1008586. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008586>.
- Naciri M., J. M. Repérant, G. Fort, J. Crespin, J. Duperray et G. Benzoni. 2011. « *Eimeria* involved in a case of coccidiosis in farmed red-legged partridges (*Alectoris rufa*) in France : oocyst isolation and gross lesion description after experimental infection ». *Avian Pathology* 40 (5): 515-24. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.606798>.
- Ngô Huân M., Mei Yang, Kerstin Paprotka, Marc Pypaert, Heinrich Hoppe et 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>.
- Nichols, Barbara A., et Mary Louise Chiappino. 1987. « Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii* 1 ». *The Journal of Protozoology* 34 (2): 217-26. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1987.tb03162.x>.
- Nishi Manami, Ke Hu, John M. Murray et David S. Roos. 2008. « Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii* ». *Journal of cell science* 121 (9): 1559-68.
- Nishimura Tamako, Nobuhiro Morone et Shiro Suetsugu. 2018. « Membrane re-modelling by BAR domain superfamily proteins via molecular and non-molecular factors ». *Biochemical Society Transactions* 46 (2): 379-89. <https://doi.org/10.1042/BST20170322>.
- Nitzsche Richard, Vyacheslav Zagoriy, Richard Lucius, et Nishith Gupta. 2016. « Metabolic Cooperation of Glucose and Glutamine Is Essential for the Lytic Cycle of Obligate Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii* ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (1): 126-41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.624619>.
- Nogareda F., Y. Le Strat, I. Villena, H. De Valk et V. Goulet. 2014. « Incidence and Prevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Women in France, 1980-2020 : Model-Based Estimation ». *Epidemiology & Infection* 142 (8): 1661-70. <https://doi.org/10.1017/S0950268813002756>.
- Nolan Sabrina J., Julia D. Romano et Isabelle Coppens. 2017. « Host Lipid Droplets: An Important Source of Lipids Salvaged by the Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii* ».

- Édité par Oliver Billker. *PLOS Pathogens* 13 (6): e1006362. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006362>.
- Nyonda Mary Akinyi, Joachim Kloehn, Piotr Sosnowski, Aarti Krishnan, Gaëlle Lentini, Bohumil Maco, Jean-Baptiste Marq, J. Thomas Hannich, Gerard Hopfgartner, et Dominique Soldati-Favre. 2022. « Ceramide Biosynthesis Is Critical for Establishment of the Intracellular Niche of *Toxoplasma gondii* ». *Cell Reports* 40 (7): 111224. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111224>.
- O'Connor Roberta M., Rehaan Shaffie, Gagandeep Kang, et Honorine D. Ward. 2011. « Cryptosporidiosis in Patients with HIV/AIDS ». *AIDS* 25 (5): 549-60. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283437e88>.
- Ogouyèmi-Hounto A., F. Agbayahoun-Chokki, Y. Sissinto Savi de Tove, B. Biokou Bankole, V. Adinsi de Souza, M. Assogba, D. Kinde-Gazard, et A. Massougbojji. 2014. « Évaluation d'un test de diagnostic rapide pour le diagnostic de la toxoplasmose chez les femmes enceintes à Cotonou (Bénin) ». *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 107 (2): 85-89. <https://doi.org/10.1007/s13149-014-0355-8>.
- Oladele T O, J S Sadiku, et C O Bewaji. 2012. « In Silico Characterization of Some Hypothetical Proteins in the Proteome of *Plasmodium falciparum* » 17 (2) : 11.
- Olayioye Monilola A., Stefanie Vehring, Peter Müller, Andreas Herrmann, Jürgen Schiller, Christoph Thiele, Geoffrey J. Lindeman, Jane E. Visvader, et Thomas Pomorski. 2005. « StarD10, a START Domain Protein Overexpressed in Breast Cancer, Functions as a Phospholipid Transfer Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (29): 27436-42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413330200>.
- Ong Yi-Ching, Michael L. Reese, et John C. Boothroyd. 2010. « *Toxoplasma* rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6 ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (37): 28731-40.
- Ooij Christiaan, Chrislaine Withers-Martinez, Alessa Ringel, Shamshad Cockcroft, Kasturi Haldar, et Michael Blackman. 2013. « Identification of a *Plasmodium falciparum* Phospholipid Transfer Protein ». *The Journal of biological chemistry* 288 (septembre). <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.474189>.
- Opitz, Corinna, et 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>.
- Organization, World Health. 2018. *WHO Expert Consultation on Rabies: Third Report*. World Health Organization.

- Ouologuem Dinkorma T., et David S. Roos. 2014. « Dynamics of the *Toxoplasma gondii* inner membrane complex ». *Journal of cell science* 127 (15): 3320-30.
- Ozgonul Cem, et Cagri Giray Besirli. 2017. « Recent Developments in the Diagnosis and Treatment of Ocular Toxoplasmosis ». *Ophthalmic Research* 57 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1159/000449169>.
- Parachoniak Christine Anna, Yi Luo, Jasmine Vanessa Abella, James H. Keen, et Morag Park. 2011. « GGA3 Functions as a Switch to Promote Met Receptor Recycling, Essential for Sustained ERK and Cell Migration ». *Developmental Cell* 20 (6): 751-63. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.007>.
- Paredes-Santos Tatiana Christina, Wanderley de Souza, et Márcia Attias. 2012. « Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii* ». *Journal of structural biology* 177 (2): 420-30.
- Park Young-Hoon et Ho-Woo Nam. 2013. « Clinical Features and Treatment of Ocular Toxoplasmosis ». *The Korean Journal of Parasitology* 51 (4): 393-99. <https://doi.org/10.3347/kjp.2013.51.4.393>.
- Pearson P. A., A. R. Piracha, H. A. Sen et G. J. Jaffe. 1999. « Atovaquone for the Treatment of *Toxoplasma* Retinochoroiditis in Immunocompetent Patients ». *Ophthalmology* 106 (1): 148-53. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(99\)90021-0](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(99)90021-0).
- Peng Duo, et Rick Tarleton. 2015. « EuPaGDT: a web tool tailored to design CRISPR guide RNAs for eukaryotic pathogens ». *Microbial Genomics* 1 (4): e000033. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000033>.
- Pernas Lena, Yaw Adomako-Ankomah, Anjali J. Shastri, Sarah E. Ewald, Moritz Treeck, Jon P. Boyle et John C. Boothroyd. 2014. « *Toxoplasma* Effector MAF1 Mediates Recruitment of Host Mitochondria and Impacts the Host Response ». Édité par Boris Striepen. *PLoS Biology* 12 (4): e1001845. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001845>.
- Pfefferkorn E. R. 1984. « Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81 (3): 908-12.
- Pieperhoff Manuela S., Miriam Schmitt, David J. P. Ferguson, et Markus Meissner. 2013. « The Role of Clathrin in Post-Golgi Trafficking in *Toxoplasma gondii* ». Édité par Mohamed Ali Hakimi. *PLoS ONE* 8 (10): e77620. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077620>.

- Pino Paco et Dominique Soldati-Favre. 2011. « Invasion et réplication chez les Apicomplexes: Tous les chemins mènent à ROM ». *médecine/sciences* 27 (6-7): 576-78. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011276005>.
- Pyziel Anna M., Michał Józwiowski et Aleksander W. Demiaszkiewicz. 2014. « Coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) of the Lowland European Bison *Bison Bonasus Bonasus* (L.) ». *Veterinary Parasitology* 202 (3): 138-44. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.014>.
- Qi Meng, Huan Zhou, Haiyan Wang, Rongjun Wang, Lihua Xiao, Michael J. Arrowood, Junqiang Li, et Longxian Zhang. 2015. « Molecular Identification of *Cryptosporidium* Spp. and *Giardia Duodenalis* in Grazing Horses from Xinjiang, China ». *Veterinary Parasitology* 209 (3): 169-72. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.030>.
- Rabenau Karen E., Afshin Sohrabi, Ashutosh Tripathy, Christopher Reitter, James W. Ajioka, Fiona M. Tomley et Vern B. Carruthers. 2001. « TgM2AP Participates in *Toxoplasma gondii* Invasion of Host Cells and Is Tightly Associated with the Adhesive Protein TgMIC2 ». *Molecular Microbiology* 41 (3): 537-47. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02513.x>.
- Rabjeau A., F. Foussard, G. Mauras, et J. F. Dubremetz. 1997. « Enrichment and Biochemical Characterization of *Toxoplasma gondii* Tachyzoite Plasmalemma ». *Parasitology* 114 (5): 421-26. <https://doi.org/10.1017/S0031182096008670>.
- Rajendran Esther, Sanduni V. Hapuarachchi, Catherine M. Miller, Stephen J. Fairweather, Yeping Cai, Nicholas C. Smith, Ian A. Cockburn, Stefan Bröer, Kieran Kirk, et Giel G. van Dooren. 2017. « Cationic Amino Acid Transporters Play Key Roles in the Survival and Transmission of Apicomplexan Parasites ». *Nature Communications* 8 (1): 14455. <https://doi.org/10.1038/ncomms14455>.
- Ralph S. A., GG van Dooren, R. F. Waller, M. J. Crawford, M. J. Fraunholz, B. J. Foth, C. J. Tonkin, D. S. Roos, et G. I. McFadden. 2004. « Metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast ». *Nature Reviews Microbiology* 2 (3). <https://findanexpert.unimelb.edu.au/scholarlywork/265831-metabolic-maps-and-functions-of-the-plasmodium-falciparum-apicoplast>.
- Rapoport Tom A. 2007. « Protein Translocation across the Eukaryotic Endoplasmic Reticulum and Bacterial Plasma Membranes ». *Nature* 450 (7170): 663-69. <https://doi.org/10.1038/nature06384>.

- Reis Bernhard, Klaus Pfeffer, et Sandra Beer-Hammer. 2009. « The orphan adapter protein SLY1 as a novel anti-apoptotic protein required for thymocyte development ». *BMC Immunology* 10 (juillet): 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-10-38>.
- Reiss Matthias, Nicola Viebig, Susan Brecht, Marie-Noelle Fourmaux, Martine Soete, Manlio Di Cristina, Jean François Dubremetz, et Dominique Soldati. 2001. « Identification and Characterization of an Escorter for Two Secretory Adhesins in *Toxoplasma gondii* ». *Journal of Cell Biology* 152 (3): 563-78. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.3.563>.
- Remington Jack S., éd. 2011. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier.
- Remington Jack S., Philippe Thulliez, et Jose G. Montoya. 2004. « Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis ». *Journal of Clinical Microbiology* 42 (3): 941-45. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.941-945.2004>.
- Ren Bingjian, Pengfei Kong, Fatima Hedar, Jos F. Brouwers, et Nishith Gupta. 2020. « Phosphatidylinositol Synthesis, Its Selective Salvage, and Inter-Regulation of Anionic Phospholipids in *Toxoplasma gondii* ». *Communications Biology* 3 (1): 750. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01480-5>.
- Restrepo Ricardo, Xiang Zhao, Harald Peter, Bao-yan Zhang, Peter Arvan, et Steven F. Nothwehr. 2007. « Structural features of vps35p involved in interaction with other subunits of the retromer complex ». *Traffic* 8 (12): 1841-53.
- Richard Dave, Lev M. Kats, Christine Langer, Casilda G. Black, Khosse Mitri, Justin A. Boddey, Alan F. Cowman, et Ross L. Coppel. 2009. « Identification of Rhoptry Trafficking Determinants and Evidence for a Novel Sorting Mechanism in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* ». *PLOS Pathogens* 5 (3): e1000328. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000328>.
- Robert-Gangneux Florence, Yvon Sterkers, Hélène Yera, Isabelle Accoceberry, Jean Menotti, Sophie Cassaing, Marie-Pierre Brenier-Pinchart, Christophe Hennequin, Laurence Delhaes, et Julie Bonhomme. 2015. « Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients: a 3-year multicenter retrospective study ». *Journal of clinical microbiology* 53 (5): 1677-84.
- Roberts F., et R. McLeod. 1999. « Pathogenesis of Toxoplasmic Retinochoroiditis ». *Parasitology Today (Personal Ed.)* 15 (2): 51-57. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(98\)01377-5](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(98)01377-5).
- Robibaro Bruno, Timothy T. Stedman, Isabelle Coppens, Huân M. Ngô, Marc Pypaert, Trevor Bivona, Hoo Woo Nam, et Keith A. Joiner. 2002. « *Toxoplasma gondii* Rab5 Enhances

- Cholesterol Acquisition from Host Cells ». *Cellular Microbiology* 4 (3): 139-52. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00178.x>.
- Rodriguez-Agudo Daniel, Maria Calderon-Dominguez, Shunlin Ren, Dalila Marques, Kaye Redford, Miguel Angel Medina-Torres, Phillip Hylemon, Gregorio Gil, et William M. Pandak. 2011. « Subcellular localization and regulation of StarD4 protein in macrophages and fibroblasts ». *Biochimica et biophysica acta* 1811 (10): 597-606. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2011.06.028>.
- Rojas Raul, Thijs van Vlijmen, Gonzalo A. Mardones, Yogikala Prabhu, Adriana L. Rojas, Shabaz Mohammed, Albert JR Heck, Graça Raposo, Peter van der Sluijs, et Juan S. Bonifacino. 2008. « Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7 ». *The Journal of cell biology* 183 (3): 513-26.
- Romand Stéphane, Martine Wallon, Jacqueline Franck, Philippe Thulliez, Francois Peyron, et Henri Dumon. 2001. « Prenatal Diagnosis Using Polymerase Chain Reaction on Amniotic Fluid for Congenital Toxoplasmosis11The Authors Thank Dr François Kieffer for His Substantial Contribution in Statistical Analyses. » *Obstetrics & Gynecology* 97 (2): 296-300. [https://doi.org/10.1016/S0029-7844\(00\)01118-2](https://doi.org/10.1016/S0029-7844(00)01118-2).
- Romano Julia D., Sabrina Sonda, Emily Bergbower, Maria Elisa Smith et Isabelle Coppens. 2013. « *Toxoplasma gondii* Salvages Sphingolipids from the Host Golgi through the Rerouting of Selected Rab Vesicles to the Parasitophorous Vacuole ». Édité par Howard Riezman. *Molecular Biology of the Cell* 24 (12): 1974-95. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-11-0827>.
- Rorman Efrat, Chen Stein Zamir, Irena Rilkis, et Hilla Ben-David. 2006. « Congenital toxoplasmosis-prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection ». *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* 21 (juin): 458-72. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.10.006>.
- Rosowski Emily E., Diana Lu, Lindsay Julien, Lauren Rodda, Rogier A. Gaiser, Kirk DC Jensen, et Jeroen PJ Saeij. 2011. « Strain-specific activation of the NF-κB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein ». *Journal of Experimental Medicine* 208 (1): 195-212.
- Rosowski Emily E., Quynh P. Nguyen, Ana Camejo, Eric Spooner, et Jeroen P. J. Saeij. 2014. « *Toxoplasma gondii* Inhibits Gamma Interferon (IFN-γ)- and IFN-β-Induced Host Cell STAT1 Transcriptional Activity by Increasing the Association of STAT1 with DNA ». *Infection and Immunity* 82 (2): 706-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.01291-13>.

- Rothova Aniki, Joke H. de Boer, Ninette H. ten Dam-van Loon, Gina Postma, Lenneke de Visser, Stephanie J. Zuurveen, Margje Schuller, Annemarie J.L. Weersink, Anton M. van Loon et Jolanda D.F. de Groot-Mijnes. 2008. « Usefulness of Aqueous Humor Analysis for the Diagnosis of Posterior Uveitis ». *Ophthalmology* 115 (2): 306-11. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2007.05.014>.
- Saeij J. P. J., S. Coller, J. P. Boyle, M. E. Jerome, M. W. White, et J. C. Boothroyd. 2007. « *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue ». *Nature* 445 (7125): 324-27.
- Saito Kota, et Toshiaki Katada. 2015. « Mechanisms for exporting large-sized cargoes from the endoplasmic reticulum ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 72: 3709-20. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1952-9>.
- Sakura Takaya, Fabien Sindikubwabo, Lena K. Oesterlin, Hugo Bousquet, Christian Slomianny, Mohamed-Ali Hakimi, Gordon Langsley, et Stanislas Tomavo. 2016a. « A critical role for *Toxoplasma gondii* vacuolar protein sorting VPS9 in secretory organelle biogenesis and host infection ». *Scientific reports* 6 (1): 1-13.
- Sana Madiha, Muhammad Rashid, Imran Rashid, Haroon Akbar, Jorge E Gomez-Marin, et Isabelle Dimier-Poisson. 2022. « Immune response against toxoplasmosis-some recent updates RH: *Toxoplasma gondii* immune response ». *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 36 (février): 03946320221078436. <https://doi.org/10.1177/03946320221078436>.
- 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 (1): 11191. <https://doi.org/10.1038/ncomms11191>.
- Saouros Savvas, Bryn Edwards-Jones, Matthias Reiss, Kovilen Sawmynaden, Ernesto Cota, Peter Simpson, Timothy J. Dowse, et al. 2005. « A Novel Galectin-like Domain from *Toxoplasma gondii* Micronemal Protein 1 Assists the Folding, Assembly, and Transport of a Cell Adhesion Complex ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (46): 38583-91. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500365200>.
- Sasai Miwa, Ariel Pradipta, et Masahiro Yamamoto. 2018. « Host Immune Responses to *Toxoplasma gondii* ». *International Immunology* 30 (3): 113-19. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy004>.

- Sasai Miwa et Masahiro Yamamoto. 2013. « Pathogen Recognition Receptors: Ligands and Signaling Pathways by Toll-Like Receptors ». *International Reviews of Immunology* 32 (2): 116-33. <https://doi.org/10.3109/08830185.2013.774391>.
- Scanga Charles A., Julio Aliberti, Dragana Jankovic, Florence Tilloy, Soumaya Bennouna, Eric Y. Denkers, Ruslan Medzhitov, et Alan Sher. 2002. « Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells ». *The Journal of Immunology* 168 (12): 5997-6001.
- Schrack Kathrin, Diana Nguyen, Wojciech M Karlowski, et Klaus FX Mayer. 2004. « START lipid/sterol-binding domains are amplified in plants and are predominantly associated with homeodomain transcription factors ». *Genome Biology* 5 (6): R41. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-6-r41>.
- Schwab J. C., C. J. Beckers, et K. A. Joiner. 1994. « The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (2): 509-13.
- Schwarz Dianne S. et Michael D. Blower. 2016. « The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 79-94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>.
- Seaman Matthew N. J., Michael E. Harbour, Daniel Tattersall, Eliot Read, et Nicholas Bright. 2009. « Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5 ». *Journal of Cell Science* 122 (14): 2371-82. <https://doi.org/10.1242/jcs.048686>.
- Seaman Matthew NJ. 2004. « Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer ». *The Journal of cell biology* 165 (1): 111-22.
- Seaman Matthew N.J., J. Michael McCaffery, et Scott D. Emr. 1998. « A Membrane Coat Complex Essential for Endosome-to-Golgi Retrograde Transport in Yeast ». *Journal of Cell Biology* 142 (3): 665-81. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.3.665>.
- Senderek Jan, Carsten Bergmann, Susanne Weber, Uwe-Peter Ketelsen, Hubert Schorle, Sabine Rudnik-Schöneborn, Reinhard Büttner, Eckhard Buchheim, et Klaus Zerres. 2003. « Mutation of the SBF2 gene, encoding a novel member of the myotubularin family, in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 4B2/11p15 ». *Human Molecular Genetics* 12 (3): 349-56. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg030>.
- Shapira Sagi, Omar S. Harb, Juan Margarit, Mariana Matrajt, Jerry Han, Alexander Hoffmann, Bruce Freedman, Michael J. May, David S. Roos, et Christopher A. Hunter. 2005.

- « Initiation and termination of NF- κ B signaling by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii* ». *Journal of cell science* 118 (15): 3501-8.
- Sharma M., et S. Caplan. 2016. « BAR Domains and BAR Domain Superfamily Proteins ». In *Organizational Cell Biology*, 2:491-502. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.20050-3>.
- Shastri Anjali J., Nicole D. Marino, Magdalena Franco, Melissa B. Lodoen, et John C. Boothroyd. 2014. « GRA25 Is a Novel Virulence Factor of *Toxoplasma gondii* and Influences the Host Immune Response ». *Infection and Immunity* 82 (6): 2595-2605. <https://doi.org/10.1128/IAI.01339-13>.
- Sheiner Lilach, Jessica L. Demerly, Nicole Poulsen, Wandy L. Beatty, Olivier Lucas, Michael S. Behnke, Michael W. White, et Boris Striepen. 2011. « A Systematic Screen to Discover and Analyze Apicoplast Proteins Identifies a Conserved and Essential Protein Import Factor ». Édité par Vern B. Carruthers. *PLoS Pathogens* 7 (12): e1002392. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002392>.
- Sheiner Lilach, Joana M. Santos, Natacha Klages, Fabiola Parussini, Noelle Jemmely, Nikolas Friedrich, Gary E. Ward, et Dominique Soldati-Favre. 2010. « *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design ». *Molecular microbiology* 77 (4): 912-29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07255.x>.
- Sheiner Lilach, et Dominique Soldati-Favre. 2008. « Protein Trafficking inside *Toxoplasma gondii* ». *Traffic* 9 (5): 636-46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00713.x>.
- Sheiner Lilach, et Boris Striepen. 2013. « Protein Sorting in Complex Plastids ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833 (2): 352-59. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.030>.
- Sher Alan, Carmen Collazzo, Charles Scanga, Dragana Jankovic, George Yap, et Julio Aliberti. 2003. « Induction and Regulation of IL-12-Dependent Host Resistance to *Toxoplasma gondii* ». *Immunologic Research* 27 (2-3): 521-28. <https://doi.org/10.1385/IR:27:2-3:521>.
- Shiba Yoko, Winfried Römer, Gonzalo A. Mardones, Patricia V. Burgos, Christophe Lamaze, et Ludger Johannes. 2010. « AGAP2 regulates retrograde transport between early endosomes and the TGN ». *Journal of cell science* 123 (14): 2381-90.
- Shunmugam Serena, Christophe-Sébastien Arnold, Sheena Dass, Nicholas J. Katris, et Cyrille Y. Botté. 2022. « The Flexibility of Apicomplexa Parasites in Lipid Metabolism ». *PLoS Pathogens* 18 (3): e1010313. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010313>.

- Sibley L. David, Ingrid R. Niesman, Steve F. Parmley, et Marie-France Cesbron-Delauw. 1995. « Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii* ». *Journal of cell science* 108 (4): 1669-77.
- Sinai A. P., P. Webster, et K. A. Joiner. 1997. « Association of Host Cell Endoplasmic Reticulum and Mitochondria with the *Toxoplasma gondii* Parasitophorous Vacuole Membrane: A High Affinity Interaction ». *Journal of Cell Science* 110 (Pt 17) (septembre): 2117-28. <https://doi.org/10.1242/jcs.110.17.2117>.
- Sinai Anthony P. 2008. « Biogenesis of and Activities at the *Toxoplasma gondii* Parasitophorous Vacuole Membrane ». In *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion: Subcellular Biochemistry*, édité par Barbara A. Burleigh et Dominique Soldati-Favre, 155-64. Subcellular Biochemistry. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_12.
- Singh Shailja, M. Mahmood Alam, Ipsita Pal-Bhowmick, Joseph A. Brzostowski et 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. 2012. « La sortiline et les voies endosomales apparentées sont les éléments clefs pour la biogénèse des organites apicaux et la virulence chez *Toxoplasma gondii* ». Phdthesis, Université du Droit et de la Santé - Lille II. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01128835>.
- 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>.
- Smith J. E. 1995. « A Ubiquitous Intracellular Parasite : The Cellular Biology of *Toxoplasma gondii* ». *International Journal for Parasitology* 25 (11): 1301-9. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(95\)00067-c](https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00067-c).
- Soccio Raymond E. et Jan L. Breslow. 2003. « StAR-Related Lipid Transfer (START) Proteins: Mediators of Intracellular Lipid Metabolism ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (25): 22183-86. <https://doi.org/10.1074/jbc.R300003200>.

- Souza Wanderley de. 2005. « Microscopy and Cytochemistry of the Biogenesis of the Parasitophorous Vacuole ». *Histochemistry and Cell Biology* 123 (1): 1-18. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0746-1>.
- Sparvoli, Daniela, et Maryse Lebrun. 2021. « Unraveling the Elusive Rhopty Exocytic Mechanism of *Apicomplexa* ». *Trends in Parasitology* 37 (7): 622-37. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.04.011>.
- Stanishneva-Konovalova Tatiana B., Charlotte F. Kelley, Tania L. Eskin, Emily M. Messelaar, Steven A. Wasserman, Olga S. Sokolova, et Avital A. Rodal. 2016. « Coordinated autoinhibition of F-BAR domain membrane binding and WASp activation by Nervous Wreck ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (38): E5552-61.
- Stedman Timothy T., A. Ross Sussmann, et Keith A. Joiner. 2003. « *Toxoplasma gondii* Rab6 Mediates a Retrograde Pathway for Sorting of Constitutively Secreted Proteins to the Golgi Complex ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (7): 5433-43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209390200>.
- Stols Lucy, Minyi Gu, Lynda Dieckman, Rosemarie Raffin, Frank R. Collart, et Mark I. Donnelly. 2002. « A New Vector for High-Throughput, Ligation-Independent Cloning Encoding a Tobacco Etch Virus Protease Cleavage Site ». *Protein Expression and Purification* 25 (1): 8-15. <https://doi.org/10.1006/pep.2001.1603>.
- Suarez Catherine, Gaëlle Lentini, Raghavendran Ramaswamy, Marjorie Maynadier, Eleonora Aquilini, Laurence Berry-Sterkers, Michael Cipriano, et al. 2019. « A Lipid-Binding Protein Mediates Rhopty Discharge and Invasion in *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* Parasites ». *Nature Communications* 10 (1): 4041. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11979-z>.
- Suetsugu Shiro, Shusaku Kurisu, et Tadaomi Takenawa. 2014. « Dynamic shaping of cellular membranes by phospholipids and membrane-deforming proteins ». *Physiological reviews* 94 (4): 1219-48.
- Sun Hui, Jin Li, Longjiang Wang, Kun Yin, Chao Xu, Gongzhen Liu, Ting Xiao, et al. 2021. « Comparative Proteomics Analysis for Elucidating the Interaction Between Host Cells and *Toxoplasma gondii* ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11 (mai): 643001. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.643001>.
- Suzuki Lisandra A., Rosângela J. Rocha et Cláudio L. Rossi. 2001. « Evaluation of Serological Markers for the Immunodiagnosis of Acute Acquired Toxoplasmosis ». *Journal of Medical Microbiology* 50 (1): 62-70. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-1-62>.

- Suzuki Yasuhiro, Manuel A. Orellana, Robert D. Schreiber et Jack S. Remington. 1988. « Interferon- γ : the Major Mediator of Resistance Against *Toxoplasma gondii* ». *Science* 240 (4851): 516-18. <https://doi.org/10.1126/science.3128869>.
- Szul Tomasz, et Elizabeth Sztul. 2011. « COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface ». *Physiology* 26 (5): 348-64.
- Tagoe Daniel, Allison Drozda, Isabelle Coppens, Bradley Coleman et Marc-Jan Gubbels. 2020. *Toxoplasma ferlin1 is a versatile and dynamic mediator of microneme trafficking and secretion*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.27.063628>.
- Tagoe Daniel N. A., Allison A. Drozda, Julia A. Falco, Tyler J. Bechtel, Eranthie Weerapana, et Marc-Jan Gubbels. 2021. « Ferlins and TgDOC2 in *Toxoplasma* Microneme, Rhoptry and Dense Granule Secretion ». *Life* 11 (3): 217. <https://doi.org/10.3390/life11030217>.
- Tammineni Prasad, Yu Young Jeong, Tuancheng Feng, Daniyal Aikal, et Qian Cai. 2017. « Impaired Axonal Retrograde Trafficking of the Retromer Complex Augments Lysosomal Deficits in Alzheimer's Disease Neurons ». *Human Molecular Genetics* 26 (22): 4352-66. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx321>.
- Tarr Paul T., Elizabeth J. Tarling, Dragana D. Bojanic, Peter A. Edwards, et Ángel Baldán. 2009. « Emerging new paradigms for ABCG transporters ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791 (7): 584-93.
- Tenter Astrid M., Anja R. Heckerroth, et Louis M. Weiss. 2000. « *Toxoplasma gondii*: from animals to humans ». *International journal for parasitology* 30 (12-13): 1217-58.
- Thorsell Ann-Gerd, Wen Hwa Lee, Camilla Persson, Marina I. Siponen, Martina Nilsson, Robert D. Busam, Tetyana Kotenyova, Herwig Schüler, et Lari Lehtiö. 2011. « Comparative Structural Analysis of Lipid Binding START Domains ». Édité par Nick Gay. *PLoS ONE* 6 (6): e19521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019521>.
- Tomavo S., R. T. Schwarz, et J. F. Dubremetz. 1989. « Evidence for Glycosyl-Phosphatidylinositol Anchoring of *Toxoplasma gondii* Major Surface Antigens ». *Molecular and Cellular Biology* 9 (10): 4576-80. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.10.4576-4580.1989>.
- Tomavo Stanislas, Christian Slomianny, Markus Meissner, et Vern B. Carruthers. 2013. « Protein trafficking through the endosomal system prepares intracellular parasites for a home invasion ». *PLoS pathogens* 9 (10): e1003629.
- Tomova Cveta, Bruno M. Humbel, Willie J. C. Geerts, Rolf Entzeroth, Joost C. M. Holthuis, et Arie J. Verkleij. 2009. « Membrane Contact Sites between Apicoplast and ER in

- Toxoplasma gondii* Revealed by Electron Tomography ». *Traffic* 10 (10): 1471-80. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00954.x>.
- Tonouhewa Arétas, Y Akpo, Sessou Philippe, C Salanon, G Aplogan, Assogba Marc, Issaka Youssao Abdou Karim, et Souaibou Farougou. 2020. « *Toxoplasma gondii* infections in pigs from south benin and assessment of breeders' knowledge about toxoplasmosis ». *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, juin, 248-56.
- Torre Alejandra de-la-, Miles Stanford, Andre Curi, Glenn J. Jaffe, et Jorge E. Gomez-Marin. 2011. « Therapy for Ocular Toxoplasmosis ». *Ocular Immunology and Inflammation* 19 (5): 314-20. <https://doi.org/10.3109/09273948.2011.608915>.
- Torres Jorge Z., Matthew K. Summers, David Peterson, Matthew J. Brauer, James Lee, Silvia Senese, Ankur A. Gholkar, et al. 2011. « The STARD9/Kif16a Kinesin Associates With Mitotic Microtubules and Regulates Spindle Pole Assembly ». *Cell* 147 (6): 1309-23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.020>.
- Travier Laetitia. 2007. « Caractérisation des protéines de granules denses de *Toxoplasma gondii*: Etude des interactions protéiques et lipidiques et du rôle des hélices alpha-amphipatiques de GRA2 ». PhD Thesis, Université Joseph-Fourier-Grenoble I.
- Travier Laetitia, Ricardo Mondragon, Jean-François Dubremetz, Karine Musset, Monica Mondragon, Sirenia Gonzalez, Marie-France Cesbron-Delauw, et Corinne Mercier. 2008. « Functional domains of the *Toxoplasma* GRA2 protein in the formation of the membranous nanotubular network of the parasitophorous vacuole ». *International journal for parasitology* 38 (7): 757-73.
- Troeger Christopher, Brigette F Blacker, Ibrahim A Khalil, Puja C Rao, Shujin Cao, Stephanie RM Zimsen, Samuel B Albertson, et al. 2018. « Estimates of the Global, Regional, and National Morbidity, Mortality, and Aetiologies of Diarrhoea in 195 Countries: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 ». *The Lancet Infectious Diseases* 18 (11): 1211-28. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30362-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30362-1).
- Tugaeva Kristina, et Nikolai Sluchanko. 2019. « Steroidogenic Acute Regulatory Protein: Structure, Functioning, and Regulation ». *Biochemistry (Moscow)* 84 (avril): 233-53. <https://doi.org/10.1134/S0006297919140141>.
- Valentini P, D Buonsenso, G Barone, D Serranti, R Calzedda, M Ceccarelli, D Speziale, R Ricci et L Masini. 2015. « Spiramycin/Cotrimoxazole versus Pyrimethamine/Sulfonamide and Spiramycin Alone for the Treatment of Toxoplasmosis in Pregnancy ». *Journal of Perinatology* 35 (2): 90-94. <https://doi.org/10.1038/jp.2014.161>.

- Velamakanni Saroj, Shen L. Wei, Tavan Janvilisri et Hendrik W. van Veen. 2007. « ABCG transporters: structure, substrate specificities and physiological roles ». *Journal of bioenergetics and biomembranes* 39 (5): 465-71.
- Velásquez Zahady D., Sara López-Osorio, Daniel Waiger, Carolina Manosalva, Learta Pervizaj-Oruqaj, Susanne Herold, Carlos Hermosilla, et Anja Taubert. 2021. « *Eimeria Bovis* Infections Induce G1 Cell Cycle Arrest and a Senescence-like Phenotype in Endothelial Host Cells ». *Parasitology* 148 (3): 341-53. <https://doi.org/10.1017/S0031182020002097>.
- Velichkova Michaella, Joe Juan, Pavan Kadandale, Steve Jean, Inês Ribeiro, Vignesh Raman, Chris Stefan, et Amy A. Kiger. 2010. « Drosophila Mtm and Class II PI3K Coregulate a PI(3)P Pool with Cortical and Endolysosomal Functions ». *Journal of Cell Biology* 190 (3): 407-25. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911020>.
- Venugopal Kannan, Syla Chehade, Elisabeth Werkmeister, Nicolas Barois, Javier Periz, Frank Lafont, Isabelle Tardieux, et al. 2020. « Rab11A Regulates Dense Granule Transport and Secretion during *Toxoplasma gondii* Invasion of Host Cells and Parasite Replication ». Édité par Michael J. Blackman. *PLOS Pathogens* 16 (5): e1008106. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008106>.
- Venugopal Kannan et 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>.
- Venugopal Kannan, Elisabeth Werkmeister, Nicolas Barois, Jean-Michel Saliou, Anais Poncet, Ludovic Huot, Fabien Sindikubwabo, et al. 2017. « Dual Role of the *Toxoplasma gondii* Clathrin Adaptor AP1 in the Sorting of Rhoptry and Microneme Proteins and in Parasite Division ». Édité par Isabelle Coppens. *PLOS Pathogens* 13 (4): e1006331. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006331>.
- Vinayak Sumiti, Mattie C. Pawlowic, Adam Sateriale, Carrie F. Brooks, Caleb J. Studstill, Yael Bar-Peled, Michael J. Cipriano, et Boris Striepen. 2015. « Genetic Modification of the Diarrhoeal Pathogen *Cryptosporidium Parvum* ». *Nature* 523 (7561): 477-80. <https://doi.org/10.1038/nature14651>.
- Vivier Emile et André Petitprez. 1969. « Le complexe membranaire superficiel et son évolution lors de l'élaboration des individus-fils chez *Toxoplasma gondii* ». *The Journal of Cell Biology* 43 (2): 329-42.
- Wallbank Bethan A., Caia S. Dominicus, Malgorzata Broncel, Nathalie Legrave, James I. MacRae, Henry M. Staines, et Moritz Trecek. 2018. « Phosphorylation of a *Toxoplasma*

- gondii* tyrosine transporter by calcium-dependent kinase 3 is important for parasite fitness ». *bioRxiv*, 339671.
- Waller Ross F., Patrick J. Keeling, Robert G. K. Donald, Boris Striepen, Emanuela Handman, Naomi Lang-Unnasch, Alan F. Cowman, Gurdyal S. Besra, David S. Roos, et Geoffrey I. McFadden. 1998. « Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (21): 12352-57.
- Wang Jin-Lei, Meng-Jie Bai, Hany M. Elsheikha, Qin-Li Liang, Ting-Ting Li, Xue-Zhen Cao, et Xing-Quan Zhu. 2020. « Novel roles of dense granule protein 12 (GRA12) in *Toxoplasma gondii* infection ». *The FASEB Journal* 34 (2): 3165-78.
- Wang Yanhua, et Hong Yin. 2014. « Research Progress on Surface Antigen 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii* ». *Parasites & Vectors* 7 (1): 180. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-180>.
- Wang Yifan, Lamba Omar Sangaré, Tatiana C. Paredes-Santos, Musa A. Hassan, Shruthi Krishnamurthy, Anna M. Furuta, Benedikt M. Markus, Sebastian Lourido, et Jeroen P. J. Saeij. 2020. « Genome-Wide Screens Identify *Toxoplasma Gondii* Determinants of Parasite Fitness in IFN γ -Activated Murine Macrophages ». *Nature Communications* 11 (1): 5258. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18991-8>.
- Weering Jan R.T. van, Edward Brown, Thomas H. Sharp, Judith Mantell, Peter J. Cullen, et Paul Verkade. 2010. « Intracellular membrane traffic at high resolution ». *Methods in cell biology* 96: 619-48. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(10\)96026-3](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(10)96026-3).
- Welti Ruth, Ernie Mui, Alexis Sparks, Sarah Wernimont, Giorgis Isaac, Michael Kirisits, Mary Roth, et al. 2007. « Lipidomic Analysis of *Toxoplasma gondii* Reveals Unusual Polar Lipids ». *Biochemistry* 46 (48): 13882-90. <https://doi.org/10.1021/bi7011993>.
- Wichers Jan Stephan, Carolina van Gelder, Gwendolin Fuchs, Julia Mareike Ruge, Emma Pietsch, Josie L. Ferreira, Soraya Safavi, et al. 2021. « Characterization of Apicomplexan Amino Acid Transporters (ApiATs) in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* ». *mSphere* 6 (6): e00743-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00743-21>.
- Wilhelm Léa P, Corinne Wendling, Benoît Védie, Toshihide Kobayashi, Marie-Pierre Chenard, Catherine Tomasetto, Guillaume Drin, et Fabien Alpy. 2017. « STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites ». *The EMBO Journal* 36 (10): 1412-33. <https://doi.org/10.15252/embj.201695917>.
- Yamaguchi Tomohiro, Irina Dulubova, Sang-Won Min, Xiaocheng Chen, Josep Rizo, et Thomas C. Südhof. 2002. « Sly1 Binds to Golgi and ER Syntaxins via a Conserved N-

- Terminal Peptide Motif ». *Developmental Cell* 2 (3): 295-305. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00125-9](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00125-9).
- Zhang Shuanglong, Xiaojing Chang, Jinguo Ma, Jing Chen, Yu Zhi, Zhenhua Li, et Dongqiu Dai. 2018. « Downregulation of STARD8 in Gastric Cancer and Its Involvement in Gastric Cancer Progression ». *OncoTargets and Therapy*. Dove Press. 21 mai 2018. <https://doi.org/10.2147/OTT.S154524>.
- Zhang Yang, Bo Shiun Lai, Mario Juhas, et Yun Zhang. 2019. « *Toxoplasma gondii* Secretory Proteins and Their Role in Invasion and Pathogenesis ». *Microbiological Research* 227 (octobre): 126293. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.06.003>.
- Zimmermann Lukas, Andrew Stephens, Seung-Zin Nam, David Rau, Jonas Kübler, Marko Lozajic, Felix Gabler, Johannes Söding, Andrei N. Lupas, et Vikram Alva. 2018. « A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at Its Core ». *Journal of Molecular Biology, Computation Resources for Molecular Biology*, 430 (15): 2237-43. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.12.007>.