



HAL
open science

Etude de la synthèse des précurseurs majeurs à la synthèse des lipides membranaires : l'acide lysophosphatidique et l'acide phosphatidique chez **Toxoplasma gondii.**

Souad Amiar

► **To cite this version:**

Souad Amiar. Etude de la synthèse des précurseurs majeurs à la synthèse des lipides membranaires : l'acide lysophosphatidique et l'acide phosphatidique chez *Toxoplasma gondii*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : . tel-01690808v1

HAL Id: tel-01690808

<https://hal.science/tel-01690808v1>

Submitted on 6 Feb 2017 (v1), last revised 23 Jan 2018 (v2)

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Virologie Microbiologie Immunologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« **Souad AMIAR** »

Thèse dirigée par « **Cyrille Botté** » et

Codirigée par « **Éric Maréchal** »

Préparée au sein de l'équipe **Apicolipid, Institute for Advanced
Biosciences (IAB)**

Dans l'École Doctorale **Chimie et Science du Vivant**

Etude de la synthèse des précurseurs majeurs à la synthèse des lipides membranaires : l'acide lysophosphatidique et l'acide phosphatidique chez *Toxoplasma gondii*.

Thèse soutenue publiquement le « **01 décembre 2016** »,

Devant le jury composé de :

M. Mohamed-Ali HAKIMI

DR, INSERM, Président

Mme. Maryse LEBRUN

DR, INSERM, DIMNP, Rapporteur

M. Sébastien MONGRAND

DR, IINRA, Rapporteur

M. Kai WENGLNIK

CR, INSERM, Examineur

M. Sébastien BESTEIRO

CR, INSERM, Examineur

M. Éric MARECHAL

DR, CEA, Examineur

M. Cyrille BOTTE

CR, CNRS, Examineur



A mes proches...

« Science, for me, gives a partial explanation for life. In so far as it goes, it is based on fact, experience and experiment. »

Rosalind Franklin

Remerciements

Au cours de cette expérience unique, le doctorat, j'ai eu la chance d'être entourée de nombreuses personnes qui m'ont encouragé et soutenu tout le long. Qu'elles trouvent dans ce travail l'expression de mes plus sincères remerciements.

Cyrille et Yoshiki, je souhaite vous renouveler mes plus sincères remerciements pour avoir dirigé et encadré ces trois ans et demi de thèse et pour vos précieux conseils. Je vous suis extrêmement reconnaissante de la confiance que vous avez su m'accorder, votre encouragement et enthousiasme permanent.

Ali et Alexandre, un grand merci pour votre disponibilité, votre aide, vos conseils, vos remarques, vos idées, vos solutions et vos suggestions, toujours très pertinentes qui m'ont permis d'ajuster mes travaux confrontés à des problématiques pratiques réelles.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour leurs remarques constructives pour le bon déroulement de mon projet doctoral.

Je remercie toutes les personnes qui ont participé de prêt et de loin au bon déroulement de ce travail, en particulier: Eric Maréchal, Dominique Soldati-Favre, Lilach Sheiner, Jean-Marc Gubbels, Laurence Berry, Bastien Touquet et Camille Brunet.

J'adresse mes remerciements aux membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail doctoral et d'apporter leur contribution pour bien finir cette magnifique expérience.

Je remercie les membres ApicoLipid pour la bonne ambiance.

En espérant n'avoir oublié personne, je tiens à remercier tous les membres de l'ancien LAPM en particulier à Catherine, Cordelia, Corinne et Gabrielle. Un grand merci à tous mes amis, avec qui j'ai pu passer d'agréables moments, à Grenoble ou ailleurs : Delphine, Felix, Remi, Julien, Azadeh, Marie, Carine, Chouaib, mes amis en Algérie pour leur soutien : Hind, Mouna et Ilyes.

Un grand et particulier merci que j'adresse à Mikael, pour son support, sa patiente, sa présence, ses soins et sa disponibilité.

Mes profonds remerciements s'adressent enfin à mon père et ma mère, ma défunte grand-mère, ma très chère sœur et mon frère –mon mentor-, ainsi que le reste de ma famille. Ils m'ont toujours épaulé, soutenu et encouragé dans mes choix. Mes parents, pour les valeurs qu'ils m'ont inculquée, leur patience et leur amour sont pour beaucoup dans l'achèvement de ce travail. C'est grâce à leur amour et soutien que j'ai atteint mes objectifs. Cette thèse vous est dédiée.

Sommaire

Table des figures	4
Tableaux	5
Liste des abréviations	6
Introduction	7
Chapitre 1 : Introduction au monde intracellulaire de <i>Toxoplasma gondii</i>	9
I- Description de <i>Toxoplasma gondii</i>	9
1- Cycle de vie de <i>T. gondii</i>	10
2- <i>Toxoplasma gondii</i> un excellent model expérimental	12
3- Structure du parasite	14
4- Un mode de vie intracellulaire	17
4-1- Invasion de la cellule hôte et établissement de la vacuole parasitophore (PV)	18
4-2- Réplication intracellulaire du parasite et l'égresse	20
II- L'apicoplaste, un organelle d'origine végétale	22
1- Découverte et origine de l'apicoplaste	22
2- Fonctions métaboliques de l'apicoplaste	25
Chapitre 2 : Métabolisme et dynamique des lipides dans la cellule	30
I- Synthèse des phosphoglycérolipides membranaires	30
1-Biosynthèse des précurseurs des glycérolipides	30
1-1- Synthèse des acides gras*	34
1-2- Elongation et désaturation des acides gras	37
1-3 Biosynthèse de l'acide phosphatidique	43
i)- Voie procaryote de synthèse d'acide phosphatidique	44
ii)- Voie eucaryote de synthèse d'acide phosphatidique	46
1-4 Biosynthèse du diacylglycérol	48
1-5 Biosynthèse du CDP-diacylglycérol	49
2- Synthèse des phosphoglycérolipides	49
2-1 Synthèse des phosphoglycérolipides par la voie CDP-DAG	49
i) Synthèse du phosphatidylglycérol et des cardiolipines	50
ii) Synthèse du phosphatidylinositol	50
iii) Synthèse de la phosphatidylsérine	51
2-2 Synthèse des phosphoglycérolipides par la voie Kennedy du DAG	52
i) Synthèse de la phosphatidyléthanolamine	53
ii) Synthèse de la phosphatidylcholine	53
II- Le PA dans la cellule	53
1- Le PA et la signalisation cellulaire	54

2- <i>Le PA, la courbure membranaire et le transport membranaire</i>	58
Chapitre 3 : Synthèse et dynamique des acyl-lipides chez les Apicomplexa	63
I- Les lipides chez les parasites <i>Apicomplexa</i> : Que connaissons-nous à ce jour	63
1- <i>Les acides gras : sources et devenir</i>	63
1.1. Synthèse <i>de novo</i> des acides gras via les voies FAS	64
1.2. Elongation des acides gras synthétisés <i>de novo</i>	70
1.3. Import des acides gras de la cellule hôte	72
2- <i>Les phosphoglycérolipides : synthèse, remodelage et destination</i>	73
Contexte et objectifs de l'étude	81
Résultats	84
Chapitre I :	85
Etude de la voie de synthèse de l'acide lysophosphatidique et son implication dans la synthèse des phospholipides membranaires chez <i>Toxoplasma gondii</i>	85
I- Préambule	86
II- Article (Page suivante)	87
III- Informations supplémentaires	127
<i>Test de l'activité glycérol 3-phosphate acyltransférase de TgATS1 chez le mutant plsB26 bactérien</i>	127
Matériels et méthodes	127
Résultats et discussion	128
Chapitre II :	132
L'acide phosphatidique et son implication dans le développement intracellulaire de <i>T. gondii</i>	132
I- Préambule	133
II- Article (page suivante)	134
<i>Abstract</i>	135
<i>Materials and Methods</i>	139
<i>Results</i>	146
<i>Discussion and conclusion</i>	158
<i>References</i>	164
III- Informations supplémentaires	189
<i>Génération du mutant inductible TgAGPAT</i>	189
Matériels et méthodes	189
Résultats et discussion	191

Discussion générale et Conclusions	195
Annexes	199
Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways – From cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids	200
Revue scientifique	200
Références	219
Curriculum vitae	234

Table des figures

FIGURE 1 : Cycle de vie de <i>T. gondii</i> dans les différents environnements.	11
FIGURE 2 : Structure du parasite <i>T. gondii</i> au stade tachyzoïte.	16
FIGURE 3 : Représentation schématique de l'organisation de la pellicule de <i>T. gondii</i>	17
FIGURE 4 : Représentation schématique du cycle lytique du tachyzoïte de <i>T. gondii</i> dans le cytoplasme de la cellule hôte.	19
FIGURE 5 : La réplication intracellulaire de tachyzoïte de <i>T. gondii</i>	21
FIGURE 6 : Endosymbiose secondaire et origine des <i>Apicomplexa</i>	24
FIGURE 7 : Les fonctions métaboliques de l'apicoplaste	29
FIGURE 8 : Les huit classes lipidiques.	34
FIGURE 9 : Le cycle de l'acide synthase (FAS).....	37
FIGURE 10 : Le cycle d'élongation (ELO).....	39
FIGURE 11 : Ensemble des élongation-desaturations des acyl-coa suivant leur synthèse <i>de novo</i> et avant leur assemblage en glycérolipide.	42
FIGURE 12 : Néo-synthèse et voies alternatives de synthèse des précurseurs des glycérolipides	44
FIGURE 13 : Voies de synthèse des précurseurs lipidiques PA, DAG et CDP-DAG...	47
FIGURE 14 : Voies d'incorporation des têtes polaires des phospholipides dans les diacylglycérols	52
FIGURE 15 : Implication du PA dans la signalisation cellulaire <i>via</i> l'activité des phospholipases	58
FIGURE 16 : Rôle du PA dans la courbure membranaire et l'interaction aux effecteurs	62
FIGURE 17 : Les parasites <i>Apicomplexa</i> possèdent un réseau complexe pour combiner la synthèse <i>de novo</i> et le remodelage des acyl-lipides	70
FIGURE 18 : Représentation des connaissances actuelles sur la synthèse des phospholipides, établies expérimentalement chez <i>P. falciparum</i> et <i>T. gondii</i>	77
FIGURE 19 : <i>TgATS1</i> ne restaure pas la croissance de la souche <i>E. coli</i> déficiente pour l'activité glycérol 3-phosphate acyltransférase BB-26	131
FIGURE 20 : Stratégie de génération du mutant inductible <i>TgAGPAT-iKO</i>	193

Tableaux

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des principaux acides gras simples, saturés et insaturés, rencontrés chez les eucaryotes.....	36
Tableau 2 : Résumé des données expérimentales sur les enzymes impliquées dans la voie FASII chez les <i>Apicomplexa</i>	69
Tableau 3 : Composition en acides gras et en phospholipides de <i>P. falciparum</i> (Pf) et <i>T. gondii</i> (Tg) entiers, des rhoptries et de la pellicule de <i>T. gondii</i> et de l'apicoplaste de <i>P. falciparum</i>	80

Liste des abréviations

- IMC : complexe membranaire interne
- IPP : isopentenyl pyrophosphate
- DMAPP : diméthyllalyl pyrophosphate DOX : deoxy-D-xylose 5-phosphate
- PDH : complexe pyruvate déshydrogénase
- FASII* : fatty acid synthesis pathway II
- ACP: acyl carrier protein
- CoA: coenzyme A
- VLCFA : very long chain fatty acid
- Elo : processus d'élongation
- G 3-P : glycérol 3-phosphate
- LPA : l'acide lysophosphatidique
- PA : acide phosphatidique
- DAG : diacylglycérol
- PLs : phospholipides
- PC : phosphatidylcholine
- PS : phosphatidylsérine
- PE : phosphatidyléthanolamine
- PG : phosphatidylglycérol
- CL : cardiolipines
- PI : phosphatidylinositol
- PIPs : phosphoinositides
- GPAT/ATS1: glycérol 3-phosphate acyltransférase
- AGPAT/LPAAT/ATS2 : *sn*-acylglycérol 3-phosphate acyltransférase
- CDP : cytidine diphosphate
- PH : pleckstrin homology
- PX : phox-homology

Introduction

Toxoplasma gondii est un parasite ayant un mode de vie dit de parasitisme intracellulaire obligatoire. Il appartient au phylum des *Apicomplexa*, organismes définis par un pôle apical complexe et unique. Ce complexe apical est constitué d'une machinerie sécrétoire spécifique essentielle à l'invasion de la cellule hôte. *T. gondii* est un eucaryote unicellulaire infectant les cellules d'animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux) dont l'Homme et provoque ainsi la toxoplasmose. La toxoplasmose est une maladie considérée comme asymptomatique dans la majorité des cas. Cependant elle peut être fatale pour le fœtus chez la femme enceinte primo-infectée et pour les personnes immunodéprimées tels que les patients atteints du SIDA et de leucémie. Parmi les parasites constituant le phylum *Apicomplexa*, on trouve aussi l'agent responsable de la malaria humaine, *Plasmodium spp.* Plus de 200 millions de cas de malaria ont été comptés en 2015 dont environ 440 000 décès (OMS, 2016). Bien que le taux de mortalité due à ce parasite ait baissé ces dernières années de 60%, près de la moitié de la population mondiale reste exposée au risque d'infection par *Plasmodium* (OMS, 2016). Il n'existe pas à ce jour de vaccin efficace contre la malaria et la toxoplasmose. De plus, on note une forte et rapide émergence de souches parasitaires résistantes aux traitements existants. La lutte et l'éradication de ces pathogènes nécessitent donc l'identification constante de nouvelles cibles et de nouveaux inhibiteurs plus efficaces. La découverte d'un organite d'origine végétale présent chez la plupart des parasites *Apicomplexa*, offre une nouvelle et potentielle cible thérapeutique. Appelé « apicoplaste », cet organite a été identifié en 1996 (*Apicomplexa plastid* ; McFadden *et al.*, 1996 ; Köhler *et al.*, 1997). Il est similaire au chloroplaste chez les plantes. L'apicoplaste fait l'objet de nombreuses études afin de comprendre son rôle pour le parasite et les voies métaboliques qu'il abrite.

Dans ce manuscrit, je décris mon travail de doctorat visant à comprendre la voie de synthèse de l'acide phosphatidique chez *T. gondii* et le rôle de l'apicoplaste dans ce processus et dans le métabolisme lipidique du parasite en général. L'acide phosphatidique est le précurseur majeur de la synthèse de tous les glycérophospholipides, les lipides membranaires. Pour cela, j'ai constitué ce manuscrit d'une introduction aux données bibliographiques divisée en trois chapitres : le premier

décrit succinctement le parasite *T. gondii* et sa biologie, le second chapitre est une brève revue sur le métabolisme des lipides et enfin le troisième chapitre résume les connaissances établies à ce jour sur le métabolisme des lipides chez les parasites *Apicomplexa*, plus particulièrement chez *T. gondii*.

Chapitre 1 : Introduction au monde intracellulaire de *Toxoplasma gondii*

I- Description de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii est un eucaryote unicellulaire haploïde identifié pour la première fois par Nicolle et Manceaux (1908) chez un rongeur nord-africain appelé le Gundi (*Ctenodactylus gundi*) et ensuite par Splendore chez le lapin au Brésil (Splendore, 1909). Cette identification a valu la nomenclature *gondii* au parasite en référence au rongeur. Un an plus tard, la nomenclature *Toxoplasma* a été attribuée à ce parasite due à sa forme en croissant (du grec *toxos* qui signifie arc). Les premières observations de toxoplasmose humaine ont été réalisées dans les années 1930 (Schwartzman *et al.*, 1948). Cependant, la description complète du cycle de vie de *T. gondii* n'a été établie que tardivement dans les années 1960 (Dubey, 1960 ; Miller *et al.*, 1970, Fig. 1). Ce parasite a une distribution mondiale très importante avec une prévalence à la toxoplasmose humaine d'environ un tiers de la population mondiale infectée (Tenter *et al.*, 2000). Ce parasite peut envahir un large panel d'organismes à sang chaud, comme les rongeurs et même les dauphins, constituant les organismes hôtes intermédiaires où se produit la reproduction asexuée. Seul les félins constituent son hôte définitif pour une reproduction sexuée (pour revue Robert-Gangneux and Darde, 2012, Fig. 1a).

T. gondii appartient au phylum des parasites *Apicomplexa* comprenant plus de 6000 espèces parasitaires (*Cryosporidium*, *Babesia* ; *Plasmodium*, *Theileria*, *Eimeria*, *Sarcocystis* ; *Neospora*...). Tous les parasites *Apicomplexa* sont des parasites intracellulaires obligatoires et possèdent un organite unique très complexe à leur extrémité apicale appelé « complexe apical » ce qui confère le nom au phylum (Tilney and Tilney, 1996).

1- Cycle de vie de *T. gondii*

T. gondii a besoin d'envahir une cellule hôte afin de se reproduire, se diviser, se développer, se différencier et se propager. Il peut infecter virtuellement toutes les cellules nucléées mammifères ou aviaires. Durant son cycle de vie, *T. gondii* peut avoir un mode de répllication sexuée (chez l'hôte dit définitif) ou asexuée (chez l'hôte dit intermédiaire, Fig. 1b). Ainsi, en fonction de son hôte, de son mode de répllication et du contexte environnemental du tissu envahi, *T. gondii* possède trois stades invasifs (Dubey *et al.*, 1998) :

- (i) le stade tachyzoïte,
- (ii) le stade bradyzoïte,
- (iii) le stade sporozoïtes.

La reproduction sexuée de *T. gondii* se fait uniquement chez l'hôte définitif (les félins). Après ingestion du tissu kystique ou de l'oocyste, les bradyzoïtes ou sporozoïtes contenus respectivement dans ces tissus, sont libérés dans l'intestin de l'animal. Cette libération est due à une destruction de la membrane kystique par les enzymes gastriques. Ensuite, le parasite entre en répllication asexuée à nombre limité et est caractérisée par la formation de merozoïtes par schizogonie. Durant la schizogonie, le noyau de la cellule mère subit de multiples divisions par mitose formant plusieurs noyaux. Le cytotinèse se produit qu'en fin du cycle de division formant de multiples cellules filles. Ainsi, les merozoïtes de *T. gondii* peuvent alors se différencier en gamètes males (microgamètes) et femelles (macrogamètes) par gamétogénèse (Fig. 1b). La fertilisation des gamètes permet la formation d'un zygote diploïde dans un oocyste qui sera excrété sous forme non sporulée dans les excréments du chat (Fig. 1b). Un oocyste mesure entre 10 à 12 μm de diamètre et peut résister à l'environnement externe plusieurs mois. La sporulation des oocystes se fait dans l'environnement extérieur et permet la formation de huit sporozoïtes (Fig. 1b).

Après ingestion du tissu kystique provenant d'un hôte intermédiaire ou de l'oocyste, les sporozoïtes sont relâchés dans l'intestin et se différencient en tachyzoïtes. C'est la forme proliférative déclenchant la reproduction asexuée du parasite. Le tachyzoïte est

caractérisé par une division et dissémination rapides chez l'hôte intermédiaire provoquant une toxoplasmose aiguë (Fig. 1b). Il se divise par endodyogenèse dans le cytoplasme de la cellule hôte (Fig. 1c) et se dissémine dans l'organisme *via* le flux sanguin (Fig. 1b). Les tachyzoïtes peuvent se différencier sous la pression du système immunitaire en bradyzoïtes qui est un stade de division lente. Les bradyzoïtes forment à terme un tissu kystique dans les cellules à faible taux de division comme les cellules du cerveau ou des muscles. Les kystes peuvent contenir une centaine voire un millier de bradyzoïtes et mesurer plus de 100 µm, c'est la phase chronique de la toxoplasmose.

Ces kystes peuvent être ré-ingérés par des hôtes intermédiaires et les bradyzoïtes seront libérés dans l'intestin et se différencient à nouveau en tachyzoïtes. Ce cas de figure est observé chez les patients immunodéficients. Ces patients peuvent être victimes de la phase aiguë de la toxoplasmose. Si cette phase aiguë de l'infection se produit chez la femme enceinte primo-infectée, le parasite peut traverser le placenta et infecter le fœtus. Cette transmission est qualifiée de congénitale et peut être fatale pour le fœtus.

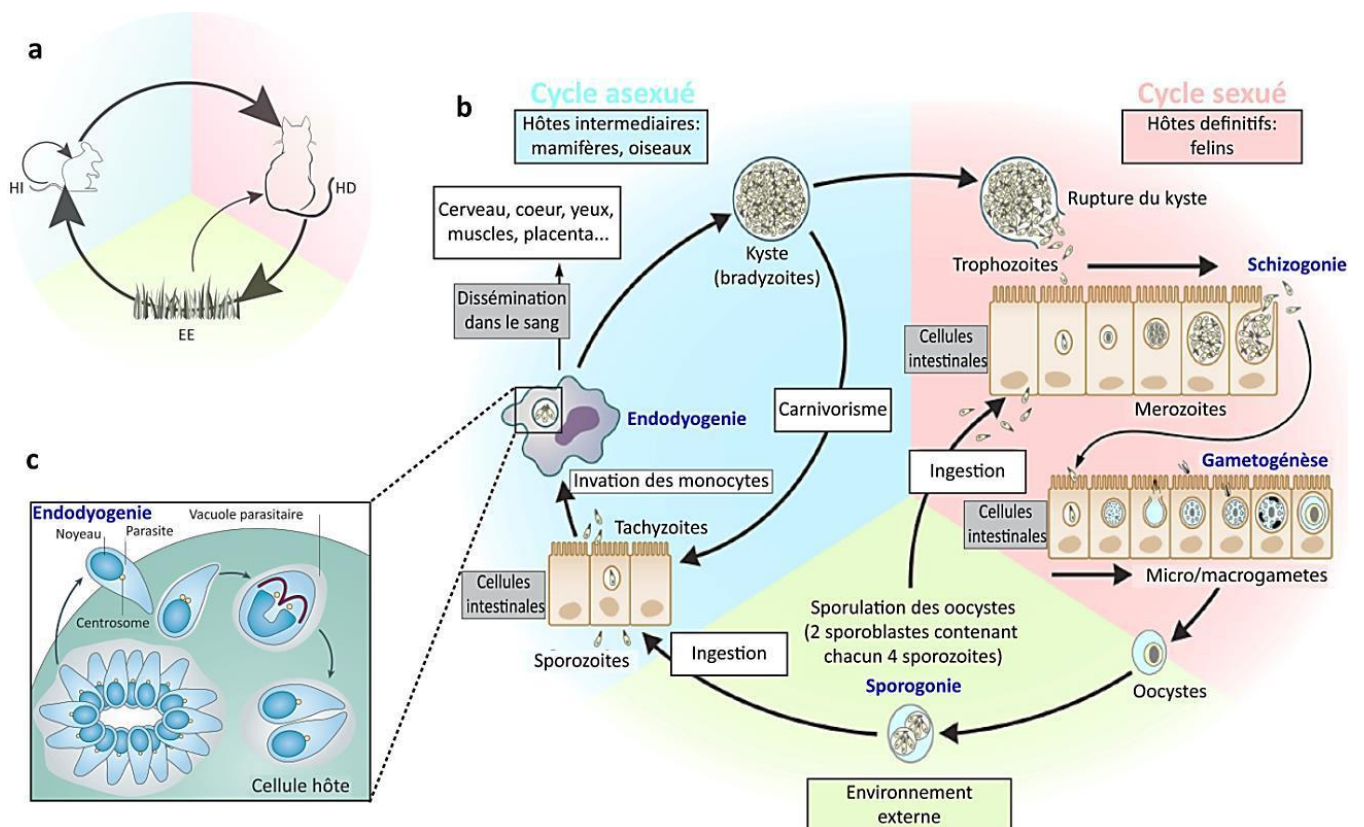


Figure 1 : Cycle de vie de *T. gondii* dans les différents environnements. a) Le cycle de vie classique du parasite entre les hôtes définitifs (HD) que sont les félins, les hôtes intermédiaires (HI) que sont les mammifères et les oiseaux et l'environnement externe (EE) où les oocystes se

disséminent. Les voies de transmission (verticales ou horizontales) sont représentées par des flèches. **b)** Représentation détaillée du cycle de vie de *T. gondii*. Après ingestion des oocystes par l'hôte définitif, le parasite se divise de manière asexuée dans un premier temps puis de manière sexuée afin de former les gamètes dans les cellules intestinales de son hôte (rose). Le nouvel oocyste est alors excrété dans l'environnement externe où il mature en formant huit sporozoïtes (jaune). Chez l'hôte intermédiaire, le parasite déclenche une division asexuée rapide par endodyogénie dans un premier lieu au niveau des cellules intestinales. Ensuite, les tachyzoïtes se disséminent dans l'organisme via le flux sanguin. Afin d'esquiver le système immunitaire de l'hôte intermédiaire, le tachyzoïte se différencie en bradyzoïte pour former un tissu kystique dans le cerveau ou les muscles (bleu). Cette représentation est adaptée de Robert-Gangneux and Darde 2012. **c)** Après l'invasion de la cellule hôte, le tachyzoïte se divise de manière exponentielle par un mode de division dit de l'endodyogénie permettant au parasite de former deux nouveaux parasites filles à l'intérieur du parasite mère. Cette division asexuée du parasite peut atteindre jusqu'à 128 parasites à partir d'un seul parasite. Cette représentation est adaptée de Francia and Striepen, 2014.

2- *Toxoplasma gondii* un excellent modèle expérimental

T. gondii est un excellent organisme modèle pour l'étude des parasites *Apicomplexa* mais également pour étudier le parasitisme intracellulaire. Plusieurs critères sont à l'origine de ce statut. La première caractéristique est la division rapide du parasite au stade tachyzoïte (toutes les 6 à 8 heures) et la maîtrise de sa propagation *in vitro* au laboratoire. Cette propagation peut se faire en utilisant plusieurs types cellulaires nucléées provenant d'animaux à sang chaud en utilisant les outils standards de la culture cellulaire. De plus, la taille du parasite (cinq fois la taille de *Plasmodium*) joue un rôle important dans cette qualification de modèle. En effet, il est facilement observable en microscopie optique et électronique ce qui permet la visualisation et l'étude des organites, des mécanismes d'invasions et de la structure complexe du parasite (pour revue dans Kim and Weiss, 2004). Le génome de *T. gondii* est constitué de 80 méga bases réparties dans 14 chromosomes. Il est entièrement séquencé, répertorié et annoté dans la base de données ToxoDB (<http://www.toxodb.org>). L'haploïdie du génome de *T. gondii* facilite les manipulations génétiques et la génération de mutants durant le stade asexué du parasite. Par conséquent, il facilite l'étude de la fonction des protéines d'intérêt. En effet, à ce jour la transfection stable ou transitoire de *T. gondii* pour l'obtention de mutants est parfaitement maîtrisée (Donald and Roos, 1993 ; Kim *et al.*, 1993 ; Soldati and Boothroyd, 1993). Cette aisance et maîtrise de la transfection de *T. gondii* a permis de développer plusieurs outils moléculaires favorisant l'intégration de segments d'ADN dans le génome du parasite par recombinaison homologue (la souche mutante $\Delta ku80$). Il a alors été possible d'étudier les gènes d'intérêt dans leur contexte

génétiq ue par introduction d'étiquette ou remplacement de gènes exprimés par leurs propres promoteurs endogènes. Parmi les outils de modifications génétiques les plus utilisés à ce jour, sont l'obtention de mutants nuls inductibles *via* le système TATi. Ce système permet d'introduire un promoteur dit « inductible » tetO (tetracycline-dependent operator) en amont du gène d'intérêt. L'activité de ce promoteur est régulée par un activateur tet-TA (tetracycline-dependent transactivator) exprimé dans la souche TATi de *T. gondii*. L'addition de l'anhydrotétracycline dans le milieu de culture inhibe la liaison de tet-TA sur le promoteur tetO conduisant à la répression de la transcription du gène d'intérêt (Meissner *et al.*, 2002). Un autre système inductible mise en place chez *T. gondii* est le système de recombinaison site-spécifique Dicre. Ce système consiste à l'insertion de ceux site LoxP de part et d'autre du gène d'intérêt, un marqueur fluorescent est alors inséré en région 3' du gène d'intérêt et un marqueur de sélection dans une souche exprimant la recombinaise « Cre » (la souche Dicre). Le marqueur fluorescent permettra la visualisation de l'activité recombinaise et ainsi l'obtention d'un mutant. La recombinaise « Cre » est inactive dans la souche Dicre. Cependant son activité enzymatique peut être reconstituée par l'addition de la rapamycine conduisant à l'excision de la région du gène d'intérêt flanquée des sites LoxP (Andenmatten *et al.*, 2013). Ces deux systèmes inductibles concernent la répression du gène d'intérêt. Cependant, il existe un autre système inductible dit DD (destabilization domain) consistant à déstabiliser l'intégrité de la protéine d'intérêt. Le système DD implique l'étiquetage de la protéine d'intérêt par le domaine DD. L'addition d'un analogue de la rapamycine, shield-1, dans le milieu de culture permet la conservation de la protéine d'intérêt. Cependant, l'absence du shield-1 dans le milieu de culture entraîne la dégradation de la protéine d'intérêt *via* son étiquette DD (Banaszynski *et al.*, 2006).

Très récemment une nouvelle approche de modification génétique a été adaptée chez *T. gondii*. Le système CRISPR-Cas9 utilise une recombinaise bactérienne. Elle coupe de manière spécifique n'importe quel gène. L'activité spécifique de la Cas9 est médiée par un ARN guide du gène d'intérêt dans n'importe quelle souche *T. gondii* (Sidik *et al.*, 2014). Cette stratégie peut être adoptée pour muter, supprimer ou étiqueter des gènes d'intérêt. L'activité de Cas9 dans *T. gondii* se fait généralement de manière transitoire et il est possible de la coupler à une protéine fluorescente pour détecter les parasites exprimant un Cas9 fluorescente active. Ce système est facilement applicable dans la génération de banques de mutants du génome entier du parasite ce qui peut être utile

pour l'étude de fonctions en cascade (Sidik *et al.*, 2016). Cependant, ce système génère des mutants stables et dans le cas de gènes essentiels, il est impossible de faire une étude phénotypique à long terme sur les mutants non viables.

3- Structure du parasite

Le tachyzoïte est le stade de développement de *T. gondii* le plus étudié : (i) son cycle de division est bien documenté, (ii) sa prolifération rapide donne un nombre important de parasites *in vitro* (iii) sa taille importante facilite son observation et son étude en microscopie. Le tachyzoïte a une forme en croissant qui mesure environ 4-8 µm de long et 2-3 µm de large (Schwartzman *et al.*, 1948). Il est constitué :

- D'une ultrastructure cytosquelette unique : des microtubules, un conoïde et un complexe membranaire interne,
- D'organites sécrétoires : des rhoptries, des micronemes et des granules denses,
- Des organites issus d'une endosymbiose : une mitochondrie et un apicoplaste,
- Des organites communs des eucaryotes : un noyau, un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi et des ribosomes,
- Et des structures spécifiques appelées acidocalcisomes.
- Tous ces organites sont entourés d'un complexe membranaire appelé la pellicule (Fig. 2).

La pellicule est un complexe membranaire bien distinct du parasite au stade invasif (Fig.3a) et typique des *Apicomplexa*. Ce complexe est constitué d'une membrane externe, qui est la membrane plasmique. Cette dernière délimite complètement le parasite depuis son pôle apical jusqu'au pôle basal (Fig. 2 membrane plasmique). La pellicule est également constituée d'une double membrane interne située à environ 15 nm de la membrane plasmique, c'est le complexe membranaire interne (IMC, Fig.2). L'IMC entoure toute la longueur du parasite mais il est interrompu au niveau du pôle apical (conoïde) et de la partie postérieure du parasite. L'IMC a un rôle très important et bien décrit dans la mise en place et la structuration des nouvelles cellules filles lors de l'endodyogenie, de la motilité du parasite et lors du processus d'invasion active de la cellule hôte (Beck *et al.*, 2010 ; Gaskins *et al.*, 2004 ; Andenmatten *et al.*, 2013 ;

Graindorge *et al.*, 2016). L'IMC est constitué de sacs membranaires aplatis appelé les alveoli (Fig 3a, c) et d'un réseau de filaments subpelliculaires (Morrissette *et al.* 1997 ; Mann and Beckers 2001, Fig. 3a). L'alveoli est à l'origine du nom du groupe *Alveolate* auquel appartiennent les parasites *Apicomplexa*. La pellicule possède un micropore qui est une invagination circulaire de la membrane plasmique provoquant une cassure de l'IMC à ce niveau. Le micropore est au niveau de la partie antérieure du parasite, juste au-dessus du noyau. A ce jour, le rôle des micropores est inconnu.

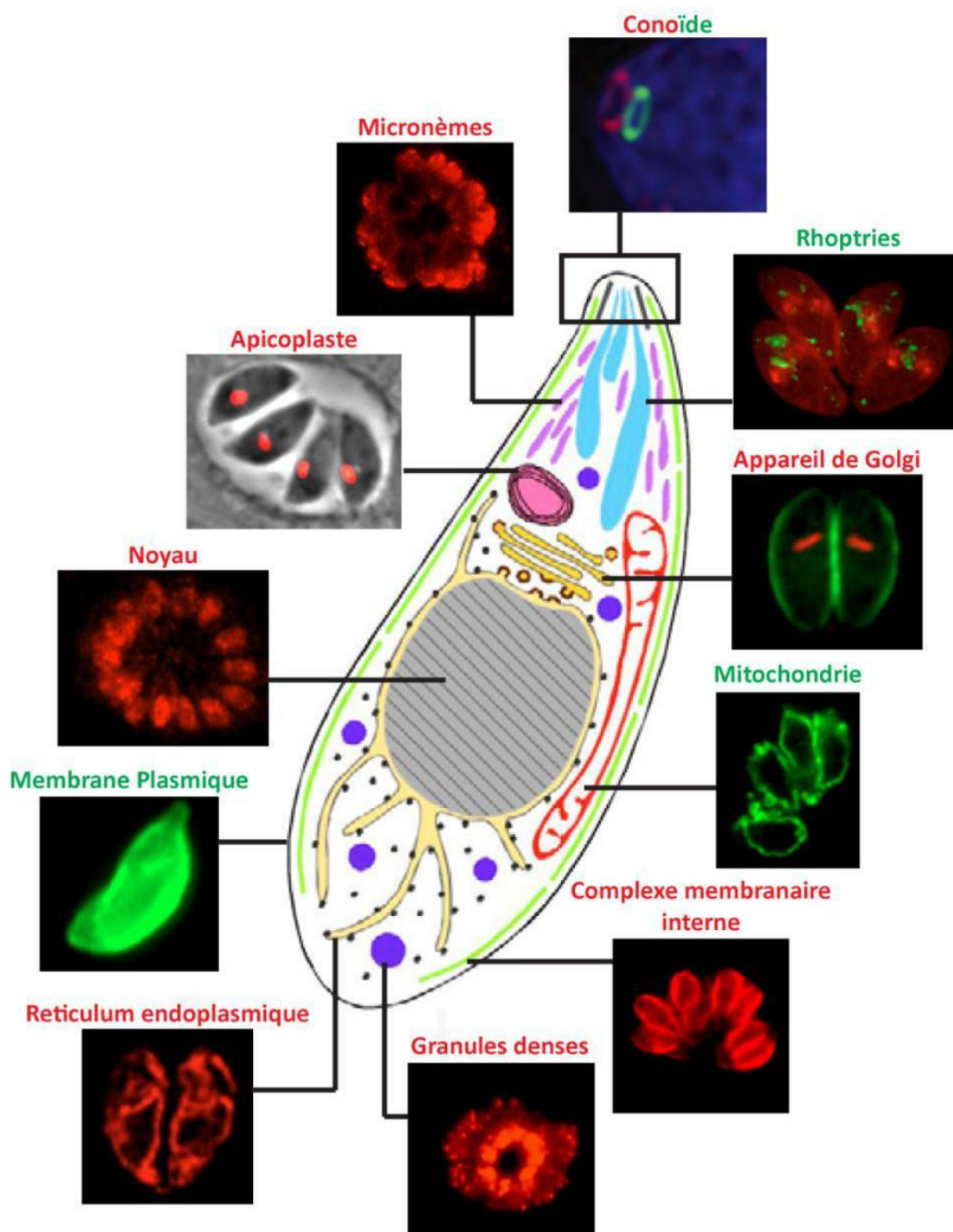


Figure 2 : Structure du parasite *T. gondii* au stade tachyzoïte. Le schéma central est une représentation des structures subcellulaires du parasite au stade invasif « tachyzoïte » avec ses différents organites (Nishi *et al.*, 2008). Les images d'immunofluorescence des rhoptries, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique sont tirées de Nishi *et al.* (2008) et celle montrant la structure en anneau du conoïde est tirée de Katris *et al.* (2014). Les autres images d'immunofluorescence ont été réalisées au cours de cette étude doctorale.

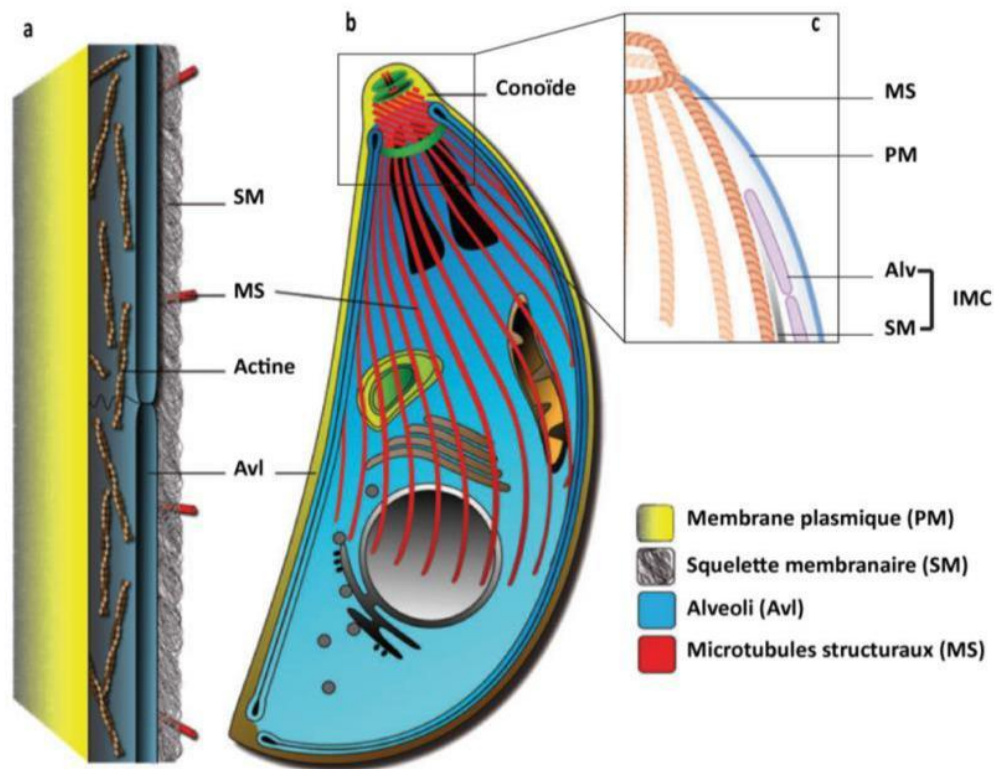


Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation de la pellicule de *T. gondii*. **a)** Agrandissement d'une représentation longitudinale de la pellicule de *T. gondii* illustrant la complexité de cette structure constituée de réseau de filaments d'actine, des alveolis (Avl) et du réseau de microtubules subpelliculaires (squelette membranaire SM). Les alveolis et les microtubules subpelliculaires constituent l'IMC qui est relié directement aux microtubules structuraux. **b)** Schéma global du réseau pelliculaire chez *T. gondii*. **c)** Représentation simplifiés de la pellicule. Les images (a) et (b) sont une adaptation de Gould *et al.* (2011) et (c) de Harding and Meissner, (2016).

4- Un mode de vie intracellulaire

T. gondii a développé des mécanismes très complexes lui permettant d'envahir efficacement la cellule hôte, d'esquiver le système immunitaire et de détourner les métabolites de la cellule hôte afin de survivre à l'intérieur de celle-ci. Dans le cytoplasme de la cellule hôte, *T. gondii* forme une nouvelle structure membranaire qui l'entoure et le protège, elle est appelée la vacuole parasitophore (PV). Isolé dans cet environnement protecteur, le parasite déclenche alors une série de division cellulaire. La réplication continue jusqu'à épuisement des nutriments de la cellule hôte où les nouveaux parasites déclenchent la lyse de la cellule hôte et égressent afin de ré-envahir à nouveau (Fig. 4). Le cycle lytique constitue ainsi la phase aigüe de l'infection par *T.*

gondii et c'est un enchaînement de l'invasion, de la réplication du parasite et de l'égressé en boucle (Fig. 4).

4-1- Invasion de la cellule hôte et établissement de la vacuole parasitophore (PV)

L'invasion de la cellule hôte est un processus essentiel pour la survie de *T. gondii*. C'est un processus actif coordonné par le cytosquelette du parasite. Elle est médiée par un moteur de myosine actine-dépendant (Kappe *et al.*, 1999 ; Heintzelman, 2015). Au contact de la cellule hôte, le parasite sécrète des adhésines pour le maintenir étroitement attaché à la cellule hôte. Ces adhésines sont les micronèmes et les rhoptries (Jewett and Sibley, 2003). Ainsi un complexe d'adhésine se forme entre le parasite et la surface de la membrane de la cellule hôte. D'autres protéines rhoptries sont sécrétées et forment un complexe RONs constitué de protéines localisées au niveau du cou des rhoptries (rhoptry neck). Ce complexe permet le redressement du parasite pour un attachement apical. Ceci favorisera la propulsion de *T. gondii* à l'intérieur de la cellule hôte. Le complexe RONs est constitué de RON2 qui s'intègre dans la membrane de la cellule hôte et de RON4 et 5 situées au niveau de la face cytoplasmique de la membrane (Besteiro *et al.*, 2009). La protéine des micronèmes AMA1 (apical membrane antigen-1) assure la liaison du pôle apical de *T. gondii* au complexe RONs (Mital *et al.*, 2005 ; Besteiro *et al.*, 2011 ; Tonkin *et al.*, 2011 ; Shen and Sibley, 2012). Ainsi se forme la jonction mobile par laquelle le parasite va pouvoir entrer dans la cellule hôte (Fig.4c, flèches blanches-d). *T. gondii* sécrète alors d'autres protéines des rhoptries, se trouvant dans le bulbe de l'organite, ROPs (rhoptry bulb protein) et des granules denses (Carruthers and Sibley, 1997 ; Bougdour *et al.*, 2013). Ceci permet la formation d'une structure membranaire non-fusogénique entourant le parasite, c'est la vacuole parasitophore (PV, Fig. 4d) (Plattner and Soldati-Favre, 2008). Les ROPs sont sécrétés en continu durant l'entrée du parasite dans la cellule hôte et jouent un rôle important dans la formation de la membrane de la PV. Ce processus implique aussi un détournement des phospholipides, des lipides neutres comme le cholestérol et des protéines de la membrane plasmique de la cellule hôte (Charron and Sibley, 2002 ; Coppens *et al.*, 2006). Une fois le parasite protégé dans la PV, une importante variété de protéines contenues dans les granules denses (Gra) est sécrétée dans l'espace vacuolaire, dans le cytoplasme, le noyau de la cellule hôte et au niveau de la membrane

de la PV essentielles à la maturation de la PV (Bougdour *et al.*, 2013 ; Mercier and Cesbron-Delauw, 2015). Les protéines GRAs sont aussi des protéines effectrices. Elles participent au processus de détournement des fonctions métaboliques de la cellule hôte en faveur du parasite nécessaires à l'établissement du parasitisme par *T. gondii* (Mercier and Cesbron-Delauw, 2015).

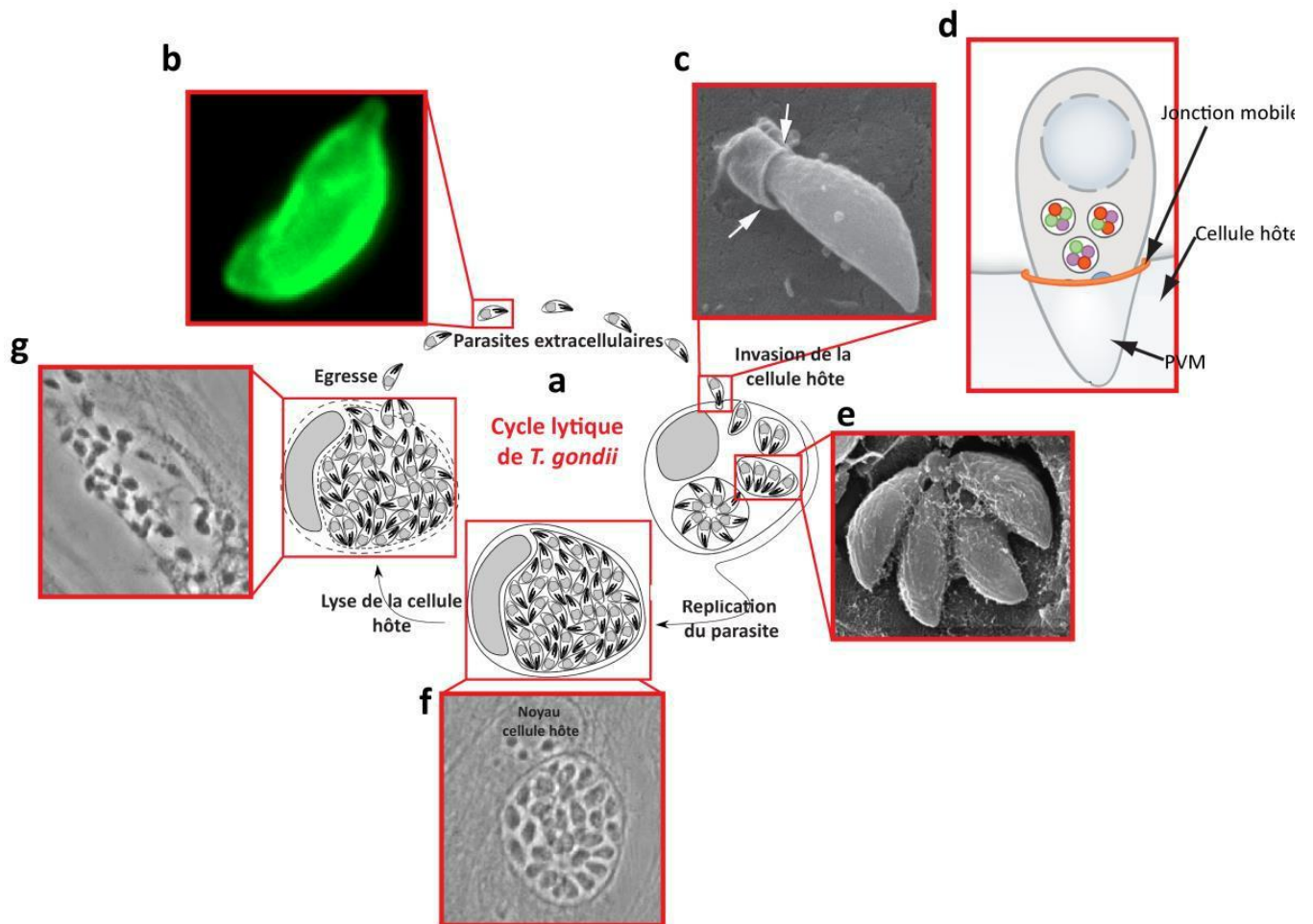


Figure 4 : Représentation schématique du cycle lytique du tachyzoïte de *T. gondii* dans le cytoplasme de la cellule hôte. a) Illustration du cycle lytique du tachyzoïte adaptée de Blader *et al.* (2015). Ce cycle commence par la motilité du parasite extracellulaire (b) par mécanisme de gliding jusqu'au contact avec les parois de la cellule hôte. Ce contact permet l'attachement du parasite à la cellule hôte et la formation d'une jonction mobile (c) suivie de l'invasion active de la cellule par le parasite. *T. gondii* forme alors la vacuole parasitophore (d) et déclenche la réplication à l'intérieur de la vacuole (e). Cette réplication est exponentielle (f) jusqu'à épuisement des ressources nutritives de la cellule hôte. *T. gondii* induit alors la lyse de la cellule hôte ce qui permet une libération active des nouveaux parasites, c'est la sortie active du parasite ou l'égresse (f). La figure (c) est une adaptation de Meissner *et al.* (2013), (d) est adaptée de Bougdour *et al.* (2014), (e) est adaptée de Muniz-Hernandez *et al.* (2011) et les figures (f ; g) sont adaptées de Eidell *et al.* (2010).

4-2- Réplication intracellulaire du parasite et l'égresse

Protégé par la PV, le parasite *T. gondii* entame un cycle de réplication exponentielle par endodyogenie passant ainsi d'un mode invasif à un mode répliatif (Fig. 1c). Cette division cellulaire est typique de *T. gondii*. Elle est caractérisée par une relation entrelacée entre la mitose et la cytokinèse qui sont finement organisées et coordonnées par le parasite (Francia and Striepen, 2014, Fig. 5). Les cellules filles sont alors formées de manière synchronisée à l'intérieur d'une cellule mère polarisée qui reste intacte tout au long de l'endodyogénie. Le centriole est mis en place pour chacune des cellules filles afin d'entamer la ségrégation des différents organites à commencer par l'appareil de Golgi (Fig. 5a-b). Après division de l'apicoplaste ; une structure spécifique de l'IMC s'organise à proximité du centriole permettant ainsi la mise en place d'une ultrastructure des nouvelles cellules filles (Gubbels *et al.*, 2001 ; Hu, 2004, Fig. 5c). Les constituants de l'IMC sont synthétisés *de novo* durant l'élongation des cellules filles jusqu'à la division complète de tous les organites de la cellule mère (Ouologuem and Roos, 2014). Une fois complètement formées, les cellules filles recyclent l'IMC de la cellule mère pour leur maturation ce qui entraîne la désintégration progressive du parasite mère à partir du pôle apical jusqu'à l'extrémité postérieure (Fig. 5d). Cette désintégration conduit à la formation d'un corps résiduel (RB pour Residual Body, Fig. 5a et d) incluant le reste du contenu de la cellule mère et de sa membrane plasmique (Fig. 5d). La réplication de *T. gondii* à l'intérieur de la cellule hôte continue jusqu'à épuisement des nutriments de la cellule hôte. A ce moment, le parasite déclenche alors le processus d'égresse suite à la perception de signaux intrinsèques. Parmi ces signaux, le flux du K^+ et Ca^{2+} dans la cellule hôte et dans la PV joue un rôle de déclencheur de l'égresse mais aussi de la motilité du parasite (Roiko and Carruthers, 2009 ; Blader *et al.*, 2015 ; Lourido and Moreno, 2015). L'accumulation des ions K^+ dans l'environnement intracellulaire de la cellule hôte maintient le parasite dans un état non-motile et réprime la sécrétion des micronèmes durant le mode répliatif (Roiko and Carruthers, 2009). L'homéostasie du Ca^{2+} dans l'espace vacuolaire et le compartiment intracellulaire prévient de l'exclusion du conoïde, de la motilité par gliding et de l'invasion (Lovett and Sibley 2003 ; Lourido and Moreno, 2015). Cependant, la réplication du parasite acidifie l'environnement vacuolaire. Par conséquent, un pH réduit et une importante concentration du Ca^{2+} intracellulaire activent la machinerie de motilité du parasite.

Aussi ces facteurs déclenchent la sécrétion des protéines impliquées dans la formation des pores tel que les protéines perforin-like (PLP1) et les protéines contenues dans les micronèmes (MIC) (Kafsack *et al.*, 2009 ; Roiko and Carruthers, 2009 ; Blader *et al.*, 2015). Ces pores sont formés au niveau de la PVM et de la membrane plasmique de la cellule hôte. Une fois la membrane plasmique détruite, les parasites sortent de la cellule hôte lysée grâce à la réactivation de leur machinerie de motilité.

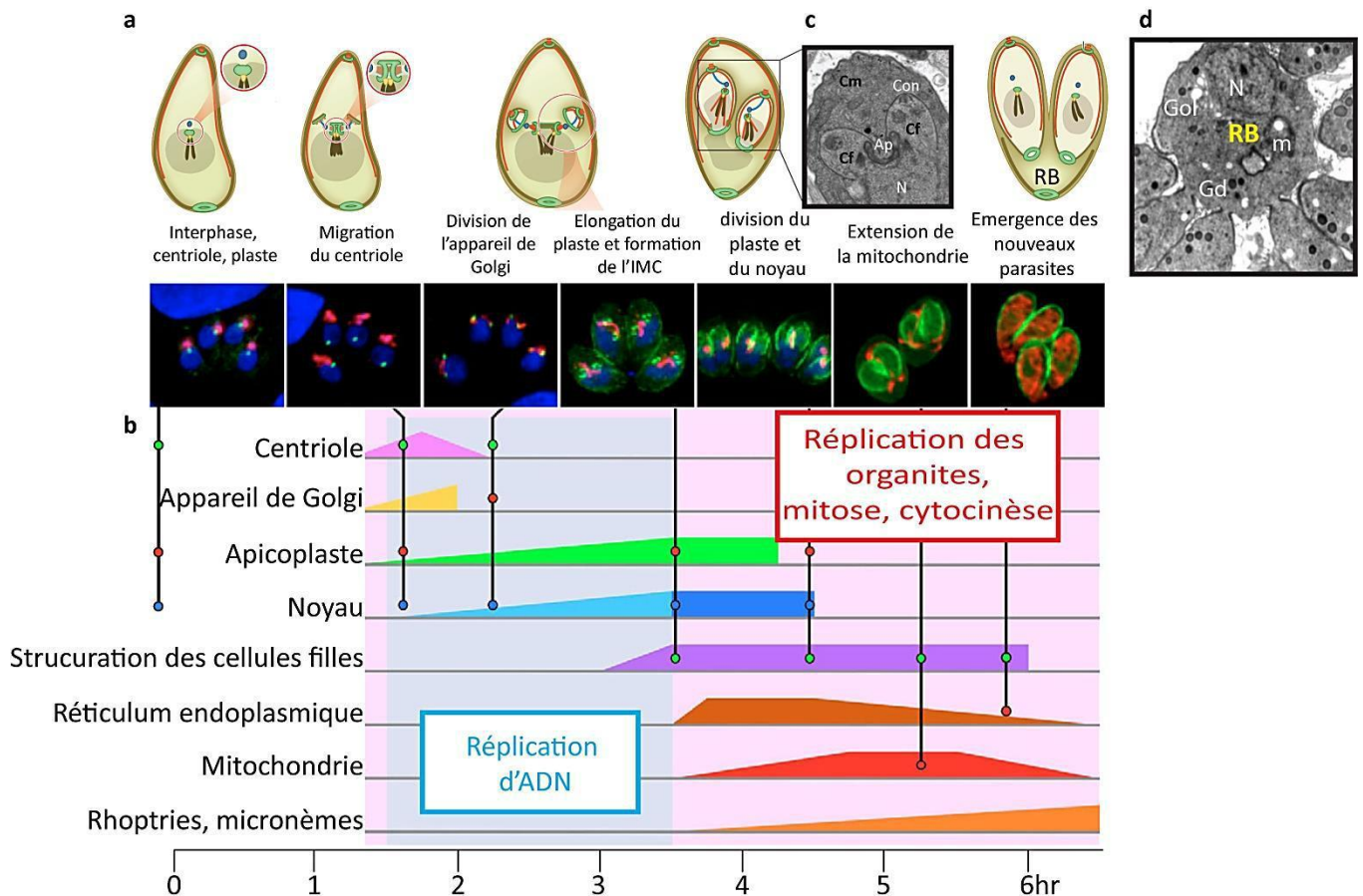


Figure 5 : La répartition intracellulaire du tachyzoïte de *T. gondii*. **a**) Représentation schématique de l'endodyogénèse adaptée de Blader *et al.* (2015) indiquant les principales étapes de la formation des cellules filles qui sont détaillées dans **(b)** de manière chronologique. Cette représentation adaptée de Nishi *et al.* (2008) est une chronologie des événements majeurs très coordonnés durant la division cellulaire de *T. gondii*. Les événements les plus visibles sont observables un peu avant la 5^{ème} heure de la division cellulaire ce qui représente environ 75 % du cycle entier. **c**) Image de microscopie électronique montrant la structure des deux cellules filles (conoïde + IMC) avec un apicoplaste en cours d'élongation et ségrégation entre les deux cellules filles ainsi que le noyau. CM : cellule mère ; Cf : cellule fille, Con : conoïde, Ap : apicoplaste. Cette photo est adaptée de Francia et Striepen (2014). **d**) Image de microscopie électronique d'un corps résiduel (RB) suite à la maturation des cellules filles. Dans le RB se trouve le reste du contenu de la cellule mère non utilisé par les cellules filles : de l'ADN (N :

noyau), l'appareil de Golgi (Gol), de la mitochondrie (m) et des granules denses (Gd). Cette image est une adaptation de Muniz-Hernandez *et al.* (2011).

II- L'apicoplaste, un organe d'origine végétale

1- Découverte et origine de l'apicoplaste

La présence d'un organe d'origine procaryotique chez les *Apicomplexa* (principalement étudié chez *T. gondii* et *Plasmodium spp*) a été révélée dans les années 1970 par l'identification d'un génome circulaire extra-chromosomal constitué de 35 k-bases (Kilejian, 1975 ; Borst *et al.*, 1984 ; Gardner *et al.*, 1991 ; Wilson *et al.*, 1996). Ce génome, similaire au génome du chloroplaste, a été séquencé pour la première fois chez *Plasmodium falciparum* par Wilson *et al.* (1996). Ce génome plastidial est constitué de répétitions d'ADN ribosomiques, de séquences codant pour : des sous-unités d'ARN polymérase de type procaryote *rpo* et des facteurs de l'élongation de la traduction *tutA* (Wilson *et al.*, 1996). Cependant, l'apicoplaste ne contient aucun gène impliqué dans la photosynthèse (Wilson *et al.*, 1996 ; Wilson and Williamson, 1997). En 1996, l'apicoplaste est alors visualisé pour la première fois par microscopies électroniques et par hybridation *in situ* (McFadden 1996 ; Köhler *et al.*, 1997 ; Waller *et al.*, 1998 ; Caballero *et al.*, 2011, Fig. 6a-d). L'organe a été nommé apicoplaste en référence au phylum *Apicomplexa* et plaste en référence au chloroplaste. Tous les parasites *Apicomplexa* contiennent un apicoplaste à l'exception des sous classes *Cryptosporidia* et *Grégarines* (Zhu *et al.*, 2000 ; Abrahamsen *et al.*, 2004 ; Xu *et al.*, 2004 ; Toso and Omoto 2007, Fig. 6e-f). Les images de microscopie électronique ont révélé la présence de quatre membranes entourant l'apicoplaste (McFadden, 1996 ; Köhler *et al.*, 1997 ; Köhler, 2005, Fig. 6a-c). Ce complexe multi-membranaire de l'apicoplaste témoigne de son origine évolutive. En effet, l'apicoplaste et le chloroplaste ont un ancêtre commun, la cyanobactérie (Fig. 6e).

La récente découverte de *Chromera velia*, un chromeride appartenant au super-phylum des *Alveolates* comme les *Apicomplexa*, confirme l'origine végétale de l'apicoplaste (Moore *et al.*, 2008). *C. velia* et *Vitrella brassicaformis* sont les deux seuls membres de ce phylum connus à ce jour. Ils sont phylogénétiquement les plus proches des *Apicomplexa*. *C. velia* est un organisme unicellulaire eucaryote mixotrophe ce qui

signifie qu'il est autotrophe grâce à la photosynthèse mais peut être hétérotrophe et vivre en symbiose avec le corail. Son chloroplaste est entouré de quatre membranes comme chez les *Apicomplexa* et possède aussi des alveolis et des microtubules subpelliculaires (Moore *et al.*, 2008 ; Obernik *et al.*, 2009). Le plaste de *C. velia* fabrique principalement de la chlorophylle a, violaxanthine et de l'isofucoxanthine (Moore *et al.*, 2008). L'absence de la chlorophylle c chez *C. velia* appui la relation très étroite entre *C. velia* et les *Apicomplexa* plus que celle des dinoflagellés avec les *Apicomplexa*, au cours de l'évolution (Moore *et al.*, 2008). Cependant, l'isofucoxanthine est un caroténoïde caractéristique des algues rouges (Fig. 6e). Ceci soutient que l'apicoplaste est un plaste non photosynthétique vestigial qui à l'origine est une algue rouge endosymbiosée (Fig. 6e).

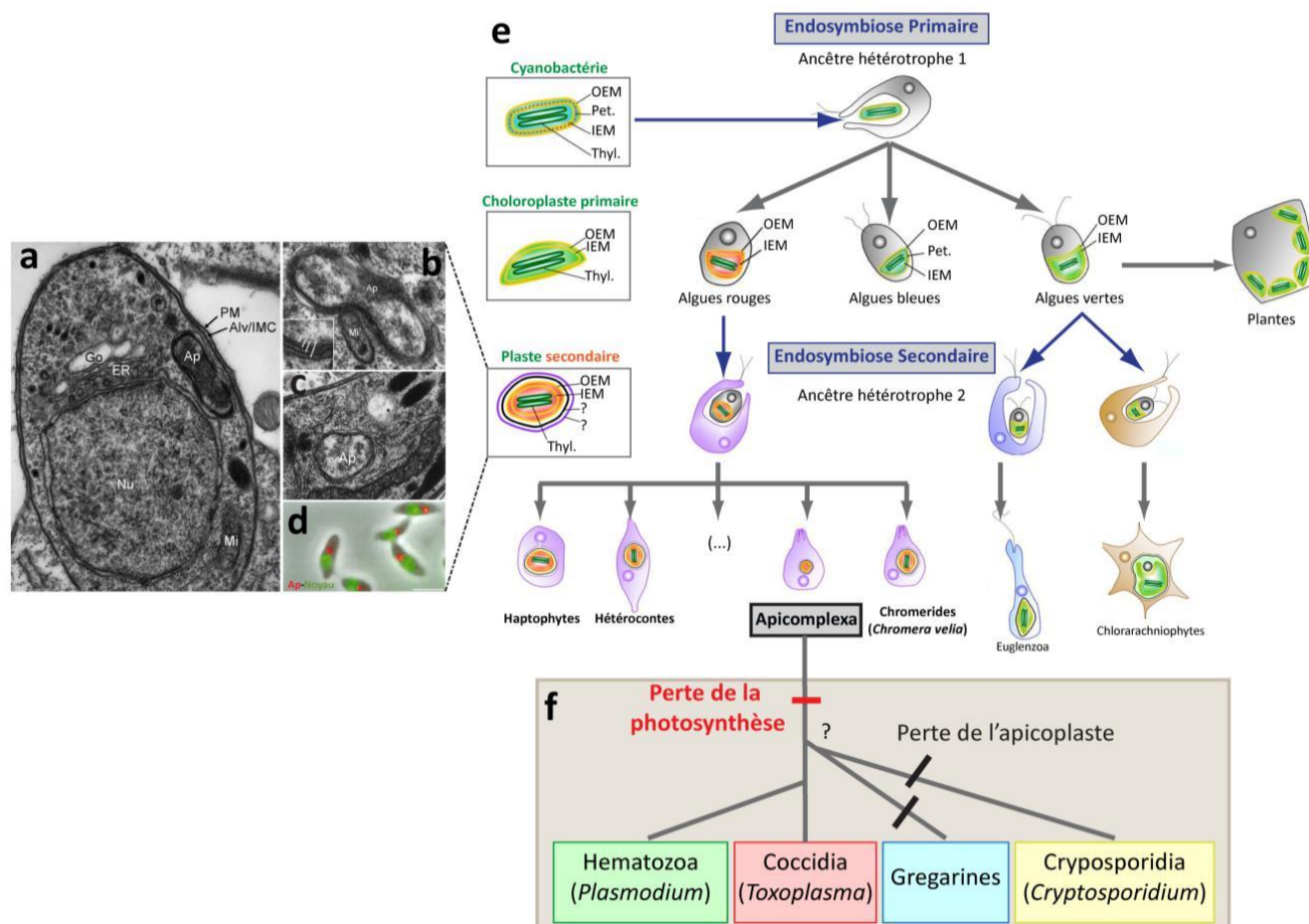


Figure 6 : Endosymbiose secondaire et origine des *Apicomplexa*. **a-c)** Observations de microscopie électronique montrant l'apicoplaste entouré de ses quatre membranes indiquées par les flèches blanches dans (b). Ap : apicoplaste, PM : membrane plasmique, Alv/IMC : alveoli/complexe membranaire interne, Go : appareil de Golgi, ER : réticulum endoplasmique, Nu : Noyau, Mi : mitochondrie. Ces images sont adaptées de (McFadden, 1996 ; Köhler *et al.*, 1997). **d)** Hybridation *in situ* du génome plastidial (rouge) ayant permis sa localisation spécifique au-dessus du noyau (vert) du tachyzoïte (Köhler *et al.*, 1997). **e)** Ce schéma adapté de Petroutsos *et al.* (2014) propose l'évolution des cyanobactéries jusqu'au *Apicomplexa*. Les algues unicellulaires sont issues d'une endosymbiose primaire de la cyanobactérie ancestrale qui a permis l'apparition du chloroplaste. Dans un deuxième temps, une algue dite rouge et une verte ont aussi été phagocytées par un autre hôte eucaryote ancestral permettant l'apparition du plaste secondaire. Celui-ci peut être entouré de trois à quatre membranes comme chez les *Apicomplexa* et les *Chromerides*. OEM : enveloppe membranaire externe, IEM : enveloppe membranaire interne, Pet. : peptidoglycane ; Thyl. : thylakoïdes. Les flèches bleues indiquent l'endosymbiose, les flèches grises indiquent l'évolution. **f)** Représentation des principaux groupes parasitaires constituant le phylum *Apicomplexa* en indiquant les événements marquants produits lors de l'évolution, à savoir la perte de la photosynthèse et la perte de l'apicoplaste.

2- Fonctions métaboliques de l'apicoplaste

La conservation de la structure vestigiale par la majorité des parasites *Apicomplexa*, implique que l'apicoplaste comporte encore une ou plusieurs fonctions vitales pour ces parasites. En effet Fischera and Roos (1997) ont démontré que l'inhibition de la réplication de l'ADN plastidial par la cyproflaxine, un inhibiteur de la gyrase plastidiale, cause la perte de l'apicoplaste et la mort de *T. gondii*. De même la perturbation de la ségrégation de l'apicoplaste par l'expression d'une protéine plastidiale fusionnée à celle des rhoptries ACP-GFP-mROP1, conduit à la mort du parasite (He *et al.*, 2001). Par ailleurs, la recherche des gènes codant les fonctions plastidiales chez *T. gondii*, *P. falciparum*, *Babesia* et *Theileria* a permis l'identification de voies de synthèses contenues dans l'apicoplaste. Ces voies sont similaires à celles du chloroplaste (Ralph *et al.*, 2004). Tous les gènes codant ces fonctions sont transcrits depuis le génome nucléaire du parasite et les protéines sont importées vers l'apicoplaste grâce à une région N-terminal d'import dite « N-terminal bipartite » (Waller *et al.*, 1997 ; Harb *et al.*, 2004). Cette région N-terminale bipartite permet un premier adressage vers le réticulum endoplasmique médié par un signal peptide. Ce signal peptide est coupé pour permettre la translocation de la protéine vers l'apicoplaste grâce à un second peptide appelé le transit peptide (Harb *et al.*, 2004). Les fonctions principales de l'apicoplaste sont :

- La biosynthèse des précurseurs isoprénoïdes (voie non-mévalonate),
- La voie procaryotique de synthèse des acides gras *FASII* (Fatty Acid Synthesis pathway II),
- La synthèse de l'acide lipoïque (LA),
- La synthèse *de novo* des précurseurs centraux des phospholipides,
- La biosynthèse des hèmes
- La synthèse des centres Fer-Soufre [Fe-S] (Fig. 7).

Les isoprénoïdes constituent une large classe de molécules lipidiques telles que le cholestérol et l'ubiquinone dont les principaux précurseurs sont l'isopentenyl pyrophosphate (IPP) et le diméthyllalyl pyrophosphate (DMAPP). Ils possèdent plusieurs fonctions cellulaires comme :

- La structuration membranaire,
- La modification des protéines par prenylation,
- La signalisation cellulaire notamment via les hormones (gibbérellines),
- La synthèse du cofacteur coenzyme Q (vitamine),
- Les pigments photosynthétiques (caroténoïdes),
- La modification des ARNt
- un des composants de défense chez les plantes (monoterpènes).

Il existe deux voies de synthèse des isoprénoïdes dans la nature :

- la voie dite mévalonate décrite chez les animaux, les champignons et les archaebactéries
- la voie dite non-mévalonate ou la voie DOXP (1 deoxy-D-xylose 5-phosphate) identifiée chez les eubactéries et le chloroplaste des algues et des plantes (pour revue Seeber and Soldati, 2010 ; Nair and Striepen, 2011 ; Botté *et al.*, 2012).

Les *Apicomplexa* ont probablement acquis la voie de synthèse des précurseurs des isoprénoïdes *via* la voie DOXP avec l'acquisition de l'apicoplaste (Jomaa *et al.*, 1999 ; Cassera *et al.*, 2004 ; Clast *et al.*, 2007 ; Nagamune *et al.*, 2008 ; Caballero *et al.*, 2011). L'inhibition de la voie DOXP par la fosmidomycine, inhibiteur de l'enzyme DOXP réductoisomérase, chez *Plasmodium* conduit au blocage de la division du parasite au stade sanguin et hépatique. Une baisse très significative de la parasitémie (<1%) *in vitro* et *in vivo* a été aussi observée (Jomaa *et al.*, 1999 ; Yeh and DeRisi, 2011 ; Nair *et al.*, 2011). Cependant, la complémentation à l'IPP des parasites traités à la fosmidomycine, permet la survie du parasite dans le globule rouge malgré la perte complète de l'apicoplaste. Ce résultat définit la voie DOXP comme fonction unique de l'apicoplaste durant le stade sanguin. L'effet de la fosmidomycine a aussi été noté chez *Babesia bovis*, homologue de *Plasmodium* chez les bovins (Caballero *et al.*, 2011). Chez *T. gondii*, la synthèse des isoprénoïdes à partir de l'IPP et DMAPP produits dans l'apicoplaste est essentielle pour le développement intracellulaire normal du parasite (Ling *et al.*, 2007 ; Nair *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2013). En effet Nair *et al.* (2011) ont montré que les mutations des gènes codant les enzymes de la voie DOXP (DOXPRI et LytB) entraînent un arrêt de la croissance du parasite conduisant à sa mort. Toutes ces

études mettent en évidence l'importance des isoprénoïdes pour les *Apicomplexa* indiquant que l'apicoplaste est la principale source d'IPP et DMAPP pour le parasite, principalement durant le stade sanguin de *Plasmodium*. Cette voie de synthèse représente une bonne cible thérapeutique bien que plusieurs inhibiteurs de cette voie ne semblent pas être efficaces dans tous les cas de figures (Jomaa *et al.*, 1999 ; Ling *et al.*, 2007 ; Yeh and DeRisi, 2011 ; Caballero *et al.*, 2011 ; Nair *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2013).

La découverte de la voie de synthèse des acides gras dans l'apicoplaste (Waller *et al.*, 1998 ; Waller *et al.*, 2000) a remis en question les premières croyances concernant l'incapacité des *Apicomplexa* de se fournir *de novo* de lipides. La voie *FASII* typiquement procaryotique est vitale pour *T. gondii* durant le stade tachyzoïte et pour *Plasmodium* durant le stade hépatique et sporozoïte dans le moustique (Mazumdar *et al.*, 2006 ; Vaughan *et al.*, 2009 ; Yu *et al.*, 2008, Schaijick *et al.*, 2014 ; Martins-Duarte *et al.*, 2016 ; Amiar *et al.*, 2016). Les acides gras sont les éléments fondamentaux pour la biogénèse des membranes, le stockage d'énergie et les modifications post-traductionnelles des protéines. *FASII* synthétise principalement le myristate C14:0 et le palmitate C16:0 chez *T. gondii* (Ramakrishnan *et al.*, 2012 ; Ramakrishnan *et al.*, 2015 ; Amiar *et al.*, 2016). La voie *FASII* ainsi que le devenir des acides gras synthétisés dans l'apicoplaste seront discutés plus en détails plus loin dans ce manuscrit (Chapitre 3. I.1).

Les acides gras en C8 produits par *FASII* sont utilisés pour la synthèse de l'acide lipoïque (Thomsen-Zieger *et al.*, 2003 ; Crawford *et al.*, 2006 ; Storm and Müller, 2012, Fig. 7). L'acide lipoïque est un disulfure cyclique avec un dérivé de l'acide octanoïque (C8). C'est un cofacteur important pour la modification de certaines protéines telle que la lipoylation de la sous unité E2 du complexe pyruvate déshydrogénase (PDH) au niveau des résidus cystéine. Le complexe PDH converti le pyruvate issu de la glycolyse en acétyl-CoA nécessaire pour la voie *FASII* dans l'apicoplaste (Fig. 7) (Foth *et al.*, 2005 ; Crawford *et al.*, 2006 ; Seeber and Soldati, 2010). Il a été démontré que la synthèse de l'acide lipoïque dans l'apicoplaste de *T. gondii* dépend complétement de la voie *FASII*. Cependant, l'apicoplaste n'est pas la seule source de LA pour le parasite. *T. gondii* a la capacité de récupérer du LA de la mitochondrie de la cellule hôte (Crawford *et al.*, 2006).

L'apicoplaste est le second site de biosynthèse des centres [Fe-S] après la mitochondrie (Seeber 2002). Les centres [Fe-S] coordonnent de manière très complexe les domaines de protéines diverses principalement au niveau des résidus cystéine et histidine. Ils permettent de fournir un potentiel redox aux protéines cibles telles que la ferrédoxine et la lipoate synthase (Ralph *et al.*, 2004 ; Seeber *et al.*, 2005).

L'acquisition de l'apicoplaste par les *Apicomplexa* leur a permis de bénéficier des voies métaboliques absentes chez leurs cellules hôtes. Contrairement aux croyances de départ, les *Apicomplexa* sont capables de se fournir par eux-mêmes d'éléments essentiels à leur développement et ne dépendent pas uniquement de la cellule hôte. De ce fait, mais aussi de par l'origine végétale et procaryotique de l'apicoplaste et des voies métaboliques qu'il arbore, les protéines actives dans l'apicoplaste sont des cibles potentielles pour le développement de traitements de type herbicides ou des antibiotiques antiparasitaires.

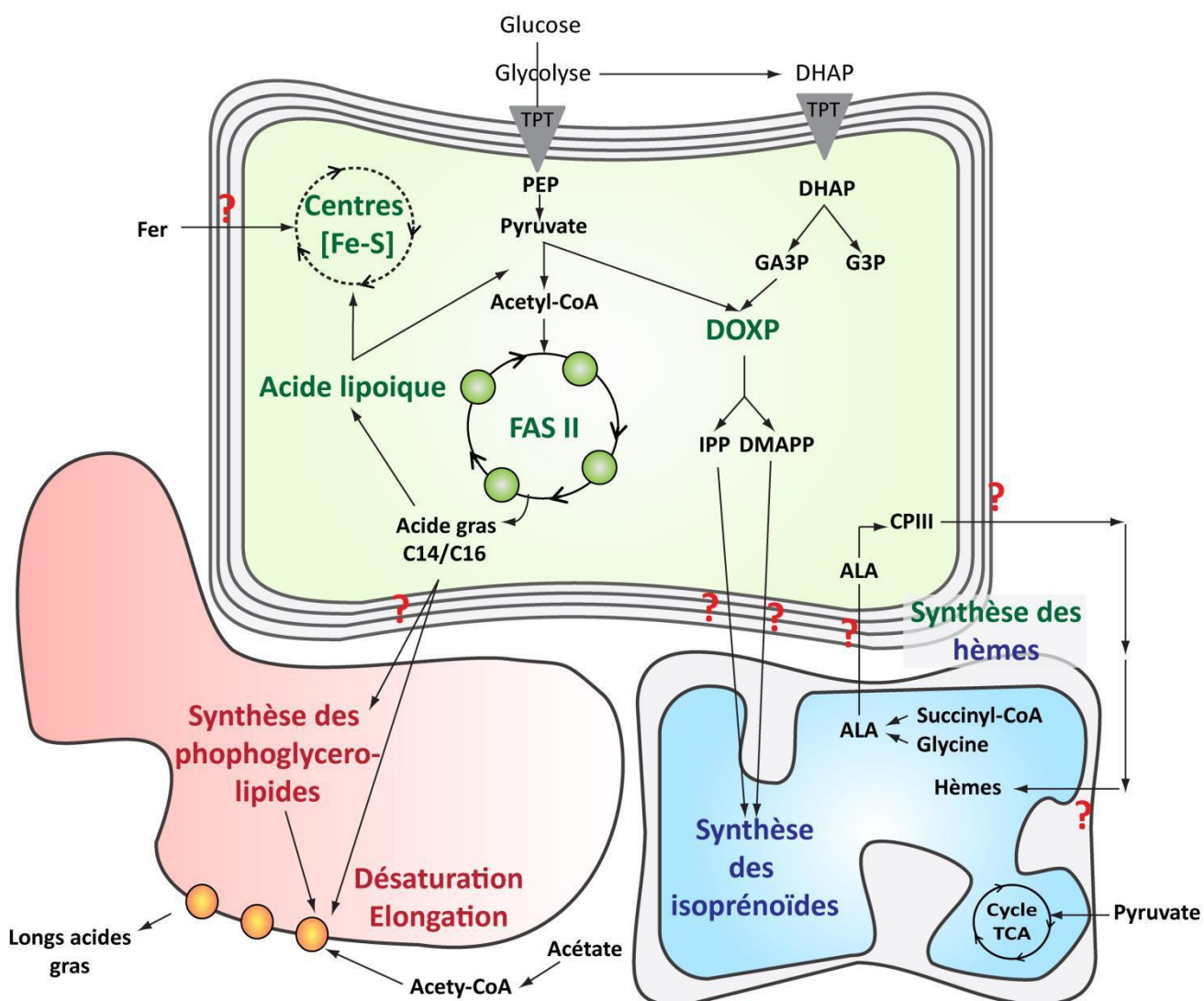


Figure 7 : Les fonctions métaboliques de l'apicoplaste. Schéma représentatif simplifié des voies métaboliques de l'apicoplaste de *T. gondii*. Ces principales fonctions sont la synthèse des acides gras via *FASII*, des précurseurs des isoprénoïdes via la voie DOXP, la synthèse de l'acide lipoiique, des centres Fer-Soufre et la synthèse des hèmes en étroite échange avec la mitochondrie et le cytosol. TPT : triose phosphate transporteur, DHAP : dihydroxyacétone phosphate, PEP, phosphoenolpyruvate, *FASII*: fatty acid synthesis pathway II, C14/C16: acides gras à chaînes longues avec 14 ou 16 carbones saturés C14:0 et C16:0. DOXP : 1-deoxy-D-xylose-5-phosphate, IPP : isopentenyl pyrophosphate, DMAPP : diméthyllalyl pyrophosphate, ALA : acide aminolevulinique, CPIII : coproporphyrinogène III. TCA : cycle de l'acide tricarboxylique.

Chapitre 2 : Métabolisme et dynamique des lipides dans la cellule

I- Synthèse des phosphoglycérolipides membranaires

Les études menées lors de mon doctorat et présentées dans ce manuscrit ont pour but de comprendre le rôle de l'apicoplaste dans la biogénèse membranaire des parasites *Apicomplexa*, plus particulièrement chez *T. gondii*. Mon travail traite la synthèse des principaux précurseurs lipidiques des phosphoglycérolipides membranaires impliquant l'apicoplaste en prenant le métabolisme lipidique chez les plantes pour modèle. Cette section a pour objectif de rassembler les connaissances et les données concernant la synthèse des lipides, l'organisation membranaire et la dynamique lipidiques dans la cellule vivante.

1-Biosynthèse des précurseurs des glycérolipides

Les lipides sont décrits comme des composés organiques insolubles dans l'eau et constituent la matière grasse chez l'être vivant (du grec *lipos* = graisse). Ceux sont des molécules solubles uniquement dans des solvants organiques (chloroforme, acétone, butanol, hexane, toluène,...) dû à leurs propriétés physico-chimiques hydrophiles/hydrophobes ou amphiphiles. Les lipides sont définis selon le procédé physique utilisé pour les isoler et non pas selon leurs structures. En effet, il existe une importante diversité structurale des lipides répertoriée dans huit classes lipidiques :

- Les acides gras,
- Les glycérolipides,
- Les phospholipides,
- Les sphingolipides,
- Les stérols,
- Les prényls,

- Les saccharolipides
- Les polycétides.

Les acides gras constituent la partie hydrophobe des lipides excepté les polycétides (Fig. 8). Ces acides gras sont des acides carboxyliques comportant une chaîne aliphatique de longueur formée de 2 à 36 carbones, majoritairement à nombre pair. Les liaisons entre les carbones peuvent être saturées (tous les atomes de carbone sont saturés en hydrogène) ou insaturées (la chaîne comporte une ou plusieurs doubles liaisons). Cette caractéristique des acides gras est importante pour la fluidité membranaire des cellules vivantes. Les acides gras sont les briques élémentaires hydrophobes constituant les glycérolipides.

Un glycérolipide peut être constitué (i) d'un à trois acides gras portés par un glycérol *via* une liaison ester (ii) et/ou un groupement polaire ou apolaire formant la « tête » hydrophile. Les glycérolipides dans les mammifères sont des sources de stockage d'énergie sous forme de triglycéride.

Dans le cas d'un groupement polaire de type phosphate sur le glycérolipide, nous parlons alors des phosphoglycérolipides (appelés aussi les phospholipides PLs). Les PLs sont les constituants majeurs des membranes biologiques.

Parmi les autres lipides membranaires, il existe aussi la classe des sphingolipides qui dérivent tous de la sphingosine. La sphingosine est reliée à l'acide gras avec une liaison amide contrairement aux glycérolipides (liaisons ester) pour former le sphingolipide. Ils sont aussi des constituants clefs de la membrane biologique avec les stérols.

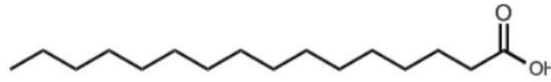
Les stérols sont des composés cycliques tel que le cholestérol, certaines hormones ou encore la vitamine D. Ils jouent des rôles bien diversifiés dans la cellule tels que le maintien de l'intégrité de la membrane biologique (cholestérol), la rigidité membranaire, la signalisation cellulaire et l'organisation de micro domaines lipidiques dans les membranes appelés « rafts ».

Les prénols ou encore les isoprénoides sont synthétisés à partir d'un précurseur à 5 carbones : l'IPP et le DMAPP et possèdent des ramifications CH₃ tout au long de la chaîne principale. Les caroténoïdes sont des prénols avec une chaîne constituée de 40 carbones et sont la classe la plus importante des isoprénoides ayant un rôle antioxydant.

Les saccharolipides sont des composés avec un squelette de sucre avec des ramifications d'acides gras. Cette structure permet une compatibilité du sucre avec la bicouche lipidique des membranes biologiques comme dans le cas du Lipide A, un constituant majeur du polysaccharide chez les bactéries à gram négatif.

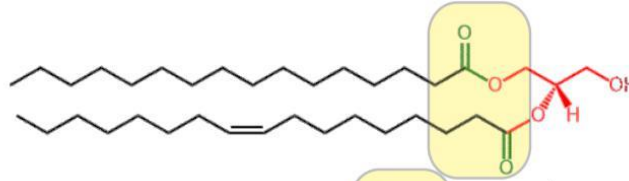
La dernière classe lipidique est les polycétides. Ceux sont des métabolites secondaires et naturels des bactéries, plantes, champignons, animaux ou encore de source marine. Ils sont synthétisés à partir d'une polymérisation d'un acétyle et d'une sous unité de propionyl. Parmi les polycétides on trouve des composés utilisés comme antibactériens ou antiparasitaires tel que l'érythromycine et tétracycline. Ces huit classes lipidiques sont représentées dans la Fig. 8.

Acide Gras
Acide palmitique (C16:0)



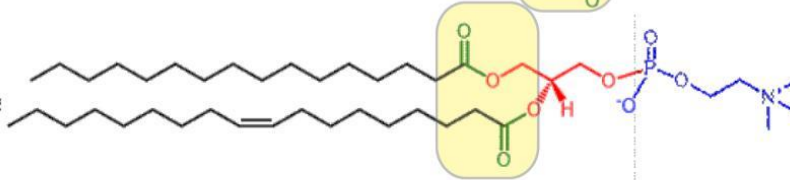
Acide Gras

Glycérolipide
DAG(16:0/16:1)



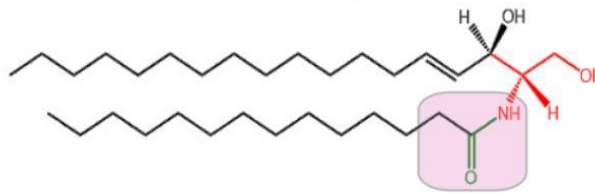
Acides gras + glycérol

Phosphoglycérolipide:
(16:0/16:1)



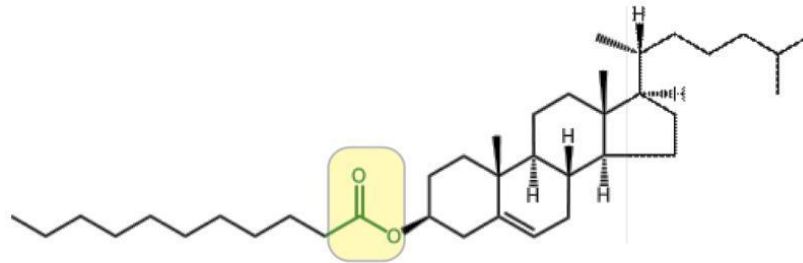
Acides gras + glycérol
+ résidu sphosphate

Sphingolipide
Ceramide (18:1/14:0)



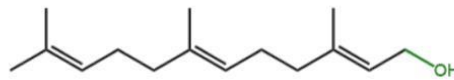
Acides gras + Sphingosine

Stérole
Ester végétale



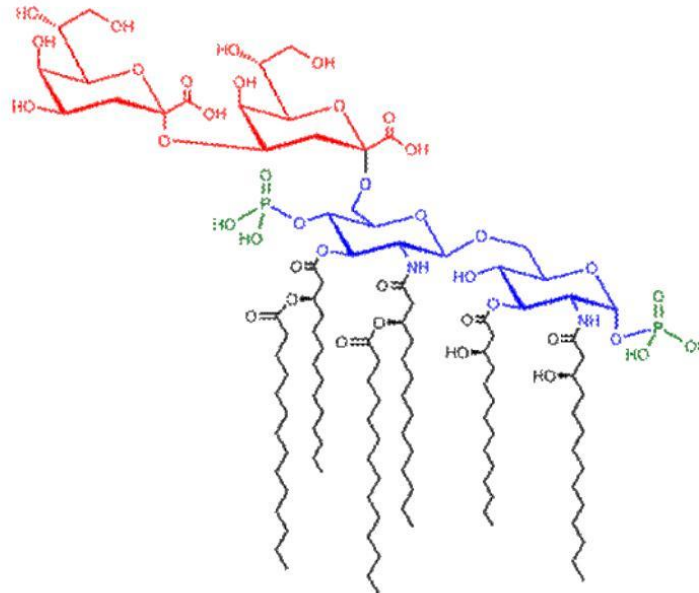
Acide gras + Cholesterol

Prénol
C15 Isoprénoïde



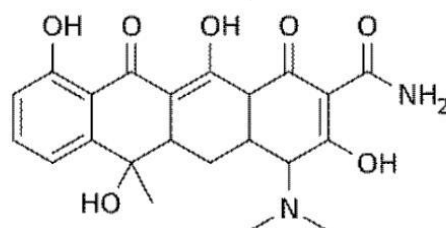
C15 Isoprénoïdes

Saccharolipide
Kdo2-Lipid A



Acides gras + Glucosamine
+ groupements phosphate
+ un résidu Kdo

Polycétide
Tétracycline



Tétracycline

Figure 8 : Les huit classes lipidiques. Cette figure a été réalisée à partir des structures des lipides les plus communs afin de représenter les huit classes lipidiques adaptées de la base de données LIPID MAPS (lipidmaps.org). Les cadres jaunes représentent la liaison ester de l'acide gras au squelette du lipide et le cadre rose représente la liaison amide caractéristique des sphingolipides.

1-1- Synthèse des acides gras¹

Un acide gras est un acide carboxylique constitué d'une taille et degrés d'insaturation variables. Un acide gras peut être simple (saturé ou insaturé) et/ou modifié par différentes molécules, comme par exemples des méthylation ou oxydations. Les acides gras les plus communs sont les acides gras à chaîne longue : C14:0, C16:0 et C18:0 pour les acides gras saturés et C16:1, C16:3, C18:1, C18:2 et C18:3 pour les insaturés (Tableau 1). La biosynthèse des acides gras se fait dans un environnement soluble (cytosol ou le stroma/matrice des plastes/mitochondries) à partir d'un substrat carboné l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA comme substrat pour l'extension de la chaîne hydrocarbonée de l'acide gras (Fig. 9a).


































La machinerie de synthèse des acides gras est appelée « acide gras synthase » (ou fatty acid synthase *FAS*). Il existe deux types de voie *FAS* :

- Type I *FAS* (*FASI*) identifiée comme la voie « eucaryote », consiste en un complexe enzymatique homodimère constitué de sept sous-unités assurant les étapes d'extension de l'acide gras (Chirala and Wakil, 2004). Ces sept activités enzymatiques ont fusionné en une seule protéine codée par un gène unique dit polykétide (Fig. 9b). Les levures ont un système intermédiaire avec 7 activités enzymatiques encodées par 2 gènes polykétides.
- Type II *FAS* (*FASII*) est constituée aussi de sept activités enzymatiques dont les protéines sont distinctes et codées par sept gènes différents (Fig. 9c). C'est une voie de synthèse dite « procaryote » décrite dans le plaste des plantes et dans les bactéries.

¹Cette partie du manuscrit a été documentée principalement à partir des bases de donnée LIPID MAPS (lipidmaps.org) et Lipid Library (<http://lipidlibrary.aocs.org/>).

La première étape de la synthèse des acides gras consiste à transférer l'acétyl sur un ACP (acyl carrier protein) depuis le coenzyme A (CoA) afin de générer l'acétyl-ACP *via* l'activité de l'acétyl-CoA-ACP transacylase (Fig. 9 [1]). L'ACP est une protéine qui fait partie du complexe enzymatique de la synthèse des acides gras et permet le maintien du substrat tout au long de la l'étape d'extension de l'acide gras. Le malonyl-CoA est ensuite produit à partir de l'acétyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase) (Fig. 9 [2a]) qui lie une molécule CO₂ à l'acétyl-CoA grâce à son groupement prosthétique de biotine. Le malonyl est aussi transféré sur un ACP pour former le malonyl-ACP *via* une malonyl-CoA-ACP transacylase ou Fab D (Fig. 9 [2b]). L'ensemble des réactions mentionnées ci-dessus se déroule au niveau d'enzymes considérées comme partie intégrante de la synthèse des acides gras. Cependant, c'est réactions ne font pas partie du complexe FAS. Ainsi, les activités de la voie FAS commencent à la réaction suivante. L'acétyl-ACP et le malonyl-ACP sont par la suite condensés ensemble par une β -kétacyl-ACP synthétase (Fab B/F) libérant une molécule de CO₂ et un ACP et forment un acétoacétyl-ACP (Fig. 9 [3]), c'est l'étape d'initiation. L'étape suivante consiste à utiliser une molécule de NADH afin de réduire le β -carbonyle en un groupe hydroxyle *via* une β -kétacyl-ACP réductase ou Fab G (Fig. 9 [4]). Le produit β -hydroxybutyryl-ACP est déshydraté au profit d'une double liaison par β -kétacyl-ACP déshydrogénase (FabZ) pour former le α - β -trans-butenoyl-ACP (Fig. 9 [5]). La dernière étape du cycle consiste en une seconde réaction de réduction par le NADH et une enoyl-ACP réductase (FabI) du α - β -trans-butenoyl-ACP pour former le squelette des acide gras, le butyryl-ACP (C4) (Fig. 9 [6]). Des molécules de malonyl-CoA sont successivement additionnées au butyryl-ACP jusqu'à sept fois voire huit fois (+ 2C à chaque cycle, Fig. 9, Tableau 1) grâce à l'action des enzymes décrites plus haut.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des principaux acides gras simples, saturés et insaturés, rencontrés chez les eucaryotes. La désignation raccourcie indique en premier chiffre, la longueur de la chaîne aliphatique et en deuxième, le nombre d'insaturations portées (Cyrille Botté, thèse, 2007).

	Nom systématique	Nom trivial	Désignation raccourcie
Acides gras saturés			
	octanoïque	Caprylique	8:0
	nonanoïque		9:0
	décanoïque	Caprique	10:0
	undécanoïque		11:0
	dodécanoïque	Laurique	12:0
	tridécanoïque		13:0
	tétradécanoïque	Myristique	14:0
	pentadécanoïque		15:0
	hexadécanoïque	Palmitique	16:0
	heptadécanoïque	Margarique	17:0
	octadécanoïque	Stéarique	18:0
	nonadécanoïque		19:0
	eicosanoïque	Arachidique	20:0
	hénicosanoïque		21:0
	docosanoïque	Béhénique	22:0
	triquésanoïque		23:0
	tétracosanoïque	Lignocérique	24:0
	pentacosanoïque		25:0
	hexacosanoïque		26:0
	heptacosanoïque		27:0
	octacosanoïque		28:0
	nonacosanoïque		29:0
	triacontanoïque		30:0
	hentriacontanoïque		31:0
	dotriacontanoïque		32:0
Acides gras insaturés			
	<i>cis</i> -9-hexadécénoïque	Palmitoléique (graisse de baleine)	16:1
	<i>cis</i> -7-hexadécénoïque	≠Palmitoléique (lipides de plantes)	16:1
	<i>trans</i> -3-hexadécénoïque	≠Palmitoléique (groupement acyl du PG chez les plantes)	16:1t
	<i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10-hexadécadiénoïque		16:2
	<i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13-hexadécatriénoïque		16:3
	<i>cis</i> -9-octadécénoïque	Oléique	18:1
	<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12-octadécadiénoïque	Linoléique	18:2
	9- <i>cis</i> ,12- <i>cis</i> ,15- <i>cis</i> -octadécatriénoïque	αLinoléique	18:3

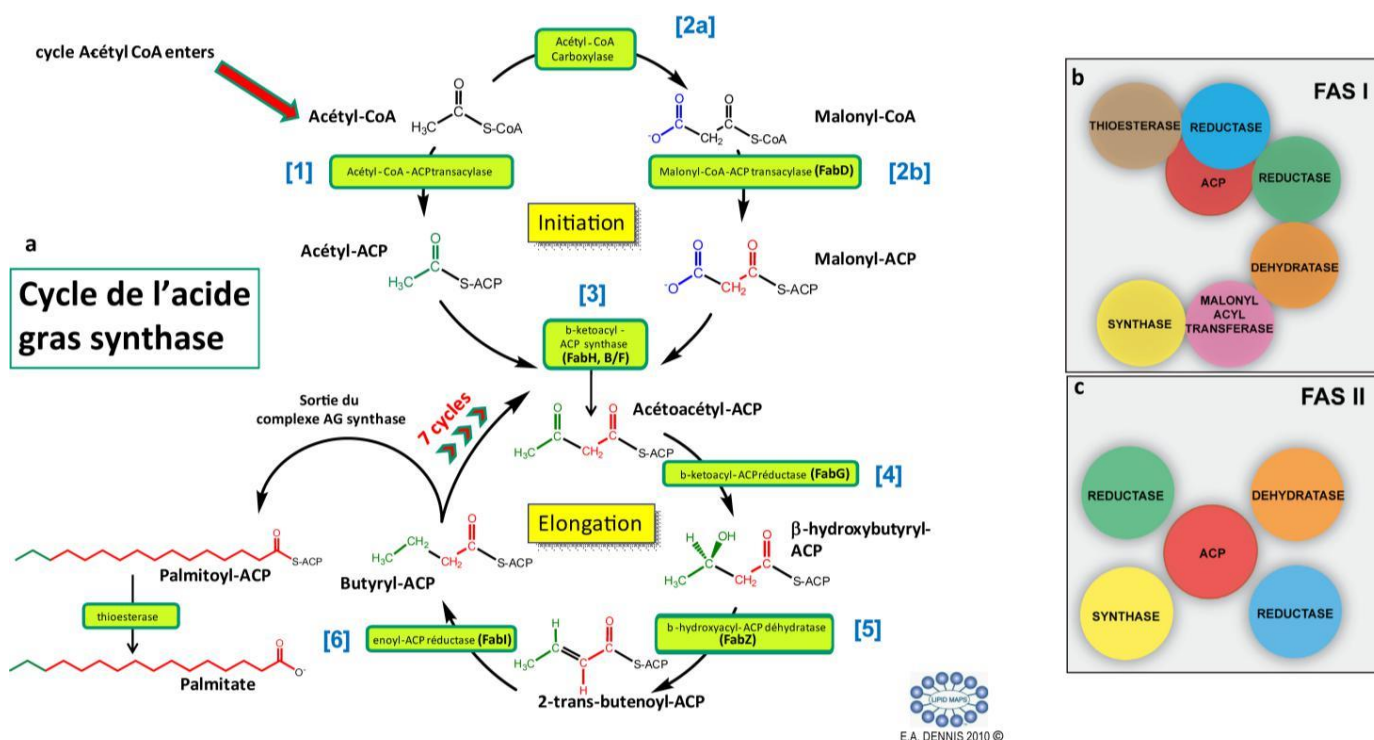


Figure 9 : Le cycle de l'acide synthase (FAS). a) Ce cycle est constitué de deux étapes principales : L'initiation de la synthèse des acides gras et l'élongation (LipidMAPS.com). b) Le complexe enzymatique homodimère constituant *FAS I* eucaryote. c) La voie procaryote *FAS II* est constitué ensemble d'enzymes séparées. (b) et (c) sont adaptés de Ramakrishnan *et al.* (2013)

1-2- Elongation et désaturation des acides gras

Les acides gras synthétisés par la voie FAS sont majoritairement C16 et une quantité minoritaire de C18, acides gras à chaîne longue. Ces acides gras sont très présents dans les membranes biologiques mais les plus majoritaires sont des acides gras à plus longues chaînes carbonées. Afin de former ces acides gras, le C16:0 et le C18:0 subissent d'autres étapes de modification et de synthèse. Les deux étapes en question sont l'élongation et la désaturation.

Les acides gras à chaînes très longues (VLCFA : very long chain fatty acid) sont des constituants très importants des organismes eucaryotes. Les VLCFA sont issus d'un processus d'élongation (Elo) assuré par le complexe enzymatique nommé les enzymes élongases. Ces enzymes existent en plusieurs isoformes formant chacune des produits spécifiques en utilisant les acides gras à chaînes longues issus du cycle d'acide gras synthase. Les acides gras VLCFA sont ensuite incorporés dans les différentes classes lipidiques décrites dans la Fig. 8. Ce processus se déroule par une addition séquentielle

de deux carbones au niveau du réticulum endoplasmique (Bach and Faure, 2010 ; Kihara, 2012). Le réticulum endoplasmique est le siège de la synthèse de tous les phospholipides. Des analyses fonctionnelles des enzymes formant le complexe d'élongases ont permis la mise en évidence du rôle important des VLCFA chez différents organismes vivants. Chaque cycle Elo est constitué de quatre réactions similaires à celles décrites dans le cycle FAS. La principale différence entre les deux voies réside dans le coenzyme A qui assure le transfert et le maintien de l'acide gras et du malonyl tout au long du cycle Elo contrairement à l'ACP dans la voie FAS. Les acides gras issus de FAS sont convertis en acyl-CoA avant condensation avec le malonyl-CoA (Kihara, 2012). La condensation est assurée par une enzyme 3-keto-acyl-CoA synthase (KCS), c'est la première étape du cycle Elo. Le produit 3-keto-acyl-CoA est ensuite réduit par la -keto-acyl-CoA réductase (KCR) produisant le 3-hydroxy-acyl-CoA. Ce dernier est ensuite déshydraté par 3-hydroxyacyl-CoA déshydratase (HCD) pour former le trans-2,3-enoyl-CoA qui sera finalement réduit par une 2,3-enoyl-CoA réductase (ECR) pour former un acyl-CoA +2 carbones allant jusqu'à des acides gras à 26 carbones (Bach and Faure, 2010 ; Kihana, 2012, Fig. 10).

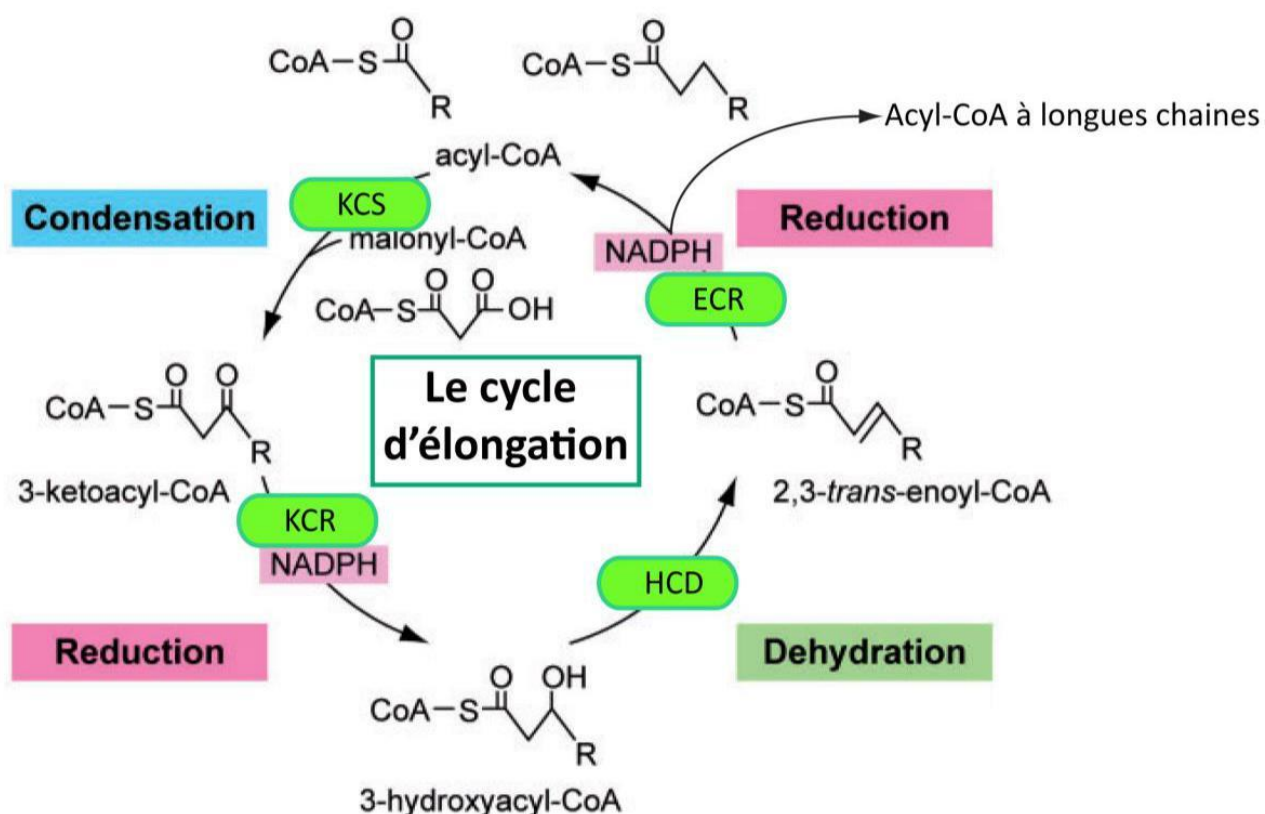


Figure 10 : Le cycle d'élongation (Elo). Ce cycle est constitué de quatre étapes : La condensation, deux étapes de réduction et une étape de déshydratation pour l'addition de deux carbones depuis le malonyl-CoA sur un acide gras acyl-CoA. Ce schéma est adapté de Kihana (2012).

Chez plusieurs organismes, l'activité KCS est codée par la famille des gènes *ELO*. Ces enzymes possèdent une spécificité pour des substrats différents en fonction de la taille de la chaîne carbonée et du niveau d'insaturation de la chaîne (Bach and Faure, 2010 ; Ohno *et al.*, 2010 ; Naganuma *et al.*, 2011 ; Ramakrishnan *et al.*, 2012). Chez les mammifères, les gènes *ELO* codent pour sept enzymes élongases (*ELOVL1-7*) ayant des spécificités différentes pour leurs substrats (Ohno *et al.*, 2010 ; Guillou *et al.*, 2010 ; Naganuma *et al.*, 2011). Il a été démontré qu'*ELOVL6* assure l'élongation du C16:0 ainsi que les acides gras à plus courte chaîne carbonée et saturée. *ELOVL3* et *ELOVL7* sont responsables de l'élongation des acides gras saturés et insaturés C16-CoA à C22-CoA avec une plus forte affinité pour C18-CoA. *ELOVL1* ajoute des carbones spécifiquement aux acides gras saturés C18:0-CoA à C26:0-CoA et mono-insaturés C20:1-CoA et C22:1-CoA. Il a aussi démontré que seuls les acides gras produits par *ELOVL1* sont les composants majeurs des sphingolipides avec des C24-CoA saturé ou mono-insaturés (Jakobsson *et al.*, 2006 ; Ohno *et al.*, 2010 ; Guillou *et al.*, 2010 ;

Naganuma *et al.*, 2011). ELOVL4 est responsable de l'élongation des acides gras jusqu'à C30-CoA voire plus. Tandis qu'ELOVL2 et ELOVL5 assurent l'élongation des acides gras poly-insaturés tel que l'acide arachidonique C20:4 et l'acide linoléique C18:3, respectivement (Jakobsson *et al.*, 2006 ; Guillou *et al.*, 2010 ; Bach et Faure, 2010).

Chez les levures, les VLCFA sont principalement assemblés en sphingolipides via l'activité d'Elop2. Cette activité est responsable de l'élongation des VLCFA jusqu'à C24-CoA et Elop3. Elle est également nécessaire pour la conversion pour des VLCFA de C24-CoA à C26-CoA (Oh *et al.*, 1997). Les plantes possèdent quatre enzymes d'élongation (FAE : fatty acid elongation) dont FAE1 et CER6. FAE1 est responsable de l'activité d'élongation des acides gras C20-CoA et C22-CoA. Tandis que CER6 catalyse l'élongation des acides gras supérieurs à 22 carbones jusqu'à 28 carbones (Bach and Faure, 2010 ; Haslam *et al.*, 2015).

Les acides poly-insaturés jouent aussi un rôle très important dans la cellule vivante, principalement dans la composition des membranes biologiques grâce à leur structure nécessaire pour la fluidité des membranes. Les acides gras libres ne peuvent pas être désaturés *in vivo* sauf s'ils sont estérifiés à un ACP, à un coenzyme A ou alors incorporés dans des lipides. La désaturation des acyl-ACP et acyl-CoA se fait de manière soluble, tandis que la désaturation des lipides se fait au niveau des membranes par des désaturases intégralement membranaires (Shanklin and Cahoon, 1998). Les enzymes désaturases permettent d'introduire des doubles liaisons généralement de conformation *cis* à des positions spécifiques de la chaîne carbonée du VLCFA : $\Delta 3$, $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 9$ et $\Delta 12$. Le ΔX indique la position à laquelle la double liaison est introduite sur l'acyl en partant du groupement carboxyle. La nomenclature oméga (ωX ou n-X) des acyles mono ou polyinsaturés fait référence à la position de la première insaturation sur l'acide gras en partant du groupement méthyl de la chaîne carbonée. Chaque réaction de désaturation consomme une molécule d'O₂ et utilise un NADH comme cofacteur (Fig. 11a). Chez les mammifères, la désaturation de l'acide stéarique C18:0 se fait via l'activité de stéaroyl-CoA désaturase (SCD) qui introduit une double liaison entre les carbones en position 9 et 10 sur la chaîne de l'acyl-CoA produisant l'acide oléique C18:1 Δ^9 (Fig. 11a). Chez les plantes, cette même réaction se produit au niveau du

réticulum endoplasmique et du chloroplaste. Dans le chloroplaste, la réaction est assurée *via* l'activité de stéaroyl-ACP désaturase (SAD) à partir d'un acyl-ACP sortant de *FASII* et non pas un acyl-CoA (Li *et al.*, 2010). SAD est unique dans le chloroplaste et utilise exclusivement des acides gras issus de *FASII*. Chez les plantes et les mammifères, la poly-insaturation des VLCFA implique différentes désaturases (fatty acid desaturases, FADS). L'acide linoléique C18:2 Δ^9, Δ^{12} et l'acide α -linoléique C18:3 $\Delta^9, \Delta^{12}, \Delta^{15}$ sont généralement synthétisés par l'action de désaturases spécifiques. Ces deux acides gras sont respectivement synthétisés à partir de l'acide stéarique par les désaturases Δ^{12} et Δ^{15} ($\omega 3$) (Shanklin and Cahoon, 1998 ; Watts and Browse, 2002 ; Guillou *et al.*, 2010). Cependant, ni Δ^{12} désaturase ni Δ^{15} désaturase utilisant l'acide oléique C18:1 Δ^9 comme substrat n'existent chez l'homme (Fig 11b). Par conséquent, ils doivent être consommés dans l'alimentation (Kihara, 2012).

En fonction des modifications qu'ils subissent tout au long de leur synthèse, les acides gras sont classés en différentes classes selon leurs structures :

- Acides gras saturés,
- Acides gras mono-insaturés
- Acides gras poly-insaturés (Tableau 1).

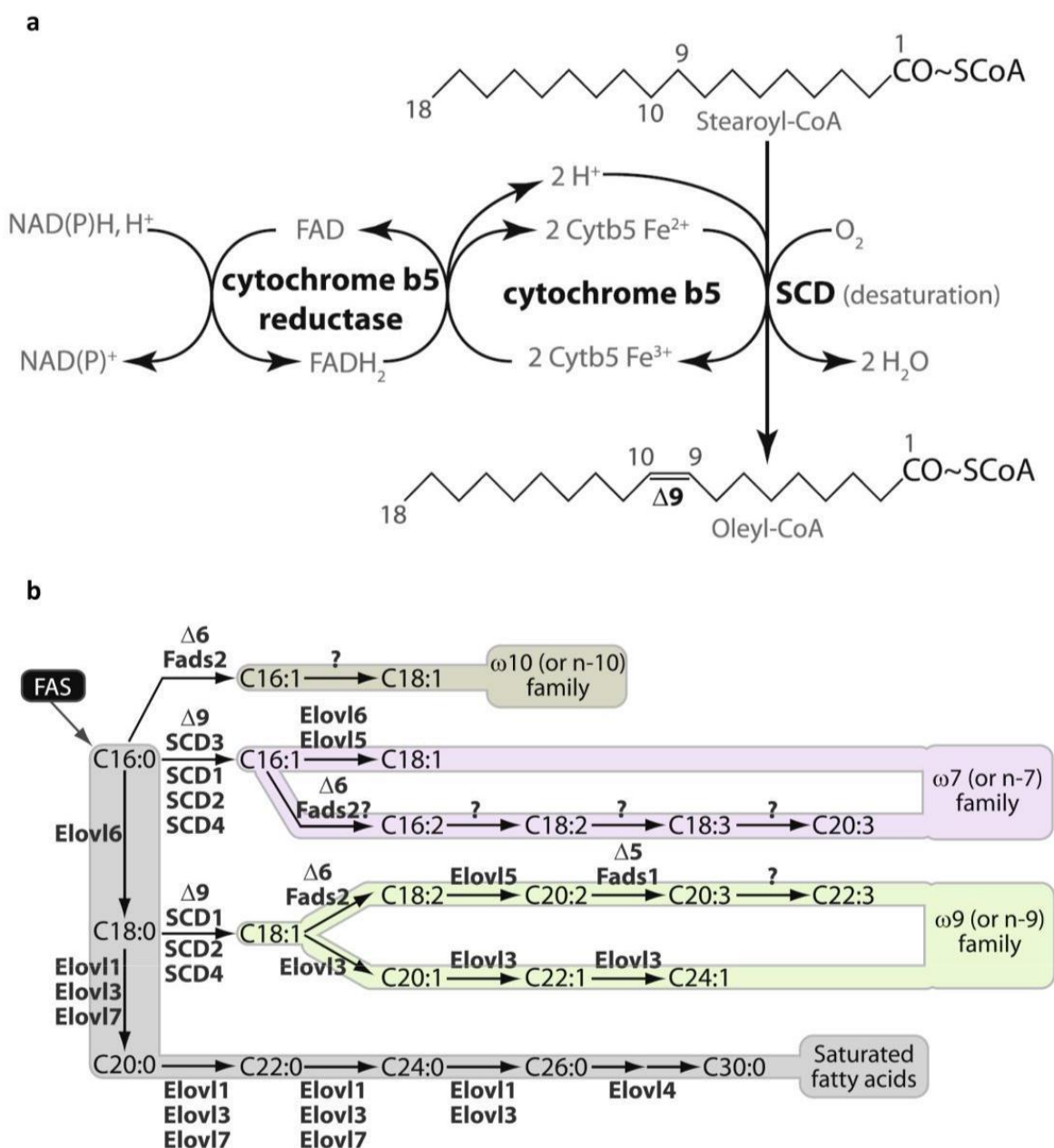


Figure 11 : Ensemble des élongation-désaturations des acyl-CoA suivant leur synthèse *de novo* et avant leur assemblage en glycérolipide. a) Exemple de la $\Delta 9$ -désaturation de l'acide stéarique C18:0 en acide oléique C18:1 Δ^9 . La désaturation se fait via l'activité de l'enzyme stéaroyl-CoA désaturase (SCD) entre les carbones 9 et 10 de l'acide gras. 1, 9, 10 et 18 indique les positions des carbones sur l'acyl-CoA. b) Représentation illustrant les réactions de la voie de désaturation chez l'homme décrites dans le réticulum endoplasmique. Les VLCFAs des séries n-10, n-7 et n-9 sont des dérivés de l'acide palmitique produit *via* FAS. Cette figure est adaptée de Guillou *et al.* (2010).

1-3 Biosynthèse de l'acide phosphatidique

L'acide phosphatidique (PA) est un lipide au centre de la synthèse de tous les glycérolipides membranaires et des triglycérides. Grâce à son rôle structurel, il est aussi un important messager secondaire dans la cellule vivante (Fig. 12). Du fait de son importance et son rôle dans la cellule, le PA est très peu abondant dans la cellule. Le PA peut être formé par différentes voies en fonction de sa destination et de sa fonction dans la cellule (Fig. 12). L'acide phosphatidique destiné à la synthèse des phospholipides membranaires est généralement synthétisé à partir du glycérol 3-phosphate (G3-P) et des acides gras néo-synthétisés par la voie *FAS*. Il existe deux voies de synthèse du PA à partir du G3-P. Une voie dite procaryotique décrite chez les bactéries et dans le plaste des organismes photosynthétiques. L'autre voie est dite eucaryote, elle est décrite dans le réticulum endoplasmique de tous les eucaryotes. Le PA peut être aussi formé via une deacétylation des triglycérides et une phosphorylation du diacylglycérol (DAG) par une diacylglycérol kinase. Dans les processus de signalisation cellulaire, le DAG provient souvent de l'activité phospholipase C du phosphatidylinositol (PI). Une autre voie alternative pour la synthèse du PA implique des phospholipases, principalement la phospholipase D (PLD) qui hydrolyse les phospholipides structuraux tels que la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE). Dans cette partie du manuscrit, nous nous intéressons principalement à la synthèse du PA destiné à la production des lipides membranaires. Cette synthèse est détaillée ci-dessus.

L'acylation du G3-P pour la synthèse du PA, se fait par l'activité de deux enzymes acyltransférases bien distinctes. L'estérification d'un premier acide gras (acyl-CoA ou acyl-ACP) néosynthétisé se fait par une enzyme glycérol 3-phosphate acyltransférase (GPAT) en position *sn-1* du G3-P. Cela permet la formation de l'acide lysophosphatidique (LPA). La notation (*sn*) correspond à la numérotation stéréochimique du carbone sur le G3-P. La seconde enzyme *sn*-acylglycérol 3-phosphate acyltransférase (AGPAT ou LPAAT pour LPA acyltransférase) assure un second transfert d'un acide gras en position *sn-2* du G3-P. Suivant les lieux de synthèse du PA et l'organisme concerné, la distribution des acides gras est différente. Deux grands groupes structuraux de lipides ont été définis. Le premier possède en position *sn-2* des acides gras C16 uniquement et en position *sn-1* du glycérol des acides gras C18 ou

C16. Il est dit de structure “procaryote” par analogie avec la composition en acides gras des glycérolipides des cyanobactéries (Fig. 13) (Heinz, 1977). Le second groupe possède principalement des acides gras C18 en position *sn*-2 et est dit de structure “eucaryote” (Fig. 13c). Cependant, cette distribution n’est pas stricte et peut diverger chez certains organismes. Chez *Staphylococcus aureus* par exemple, le PA possède un acide gras C17 en position *sn*-1 tandis que la position *sn*-2 du glycérol est estérifiée par des acides gras C15 (Yao et Rock, 2013).

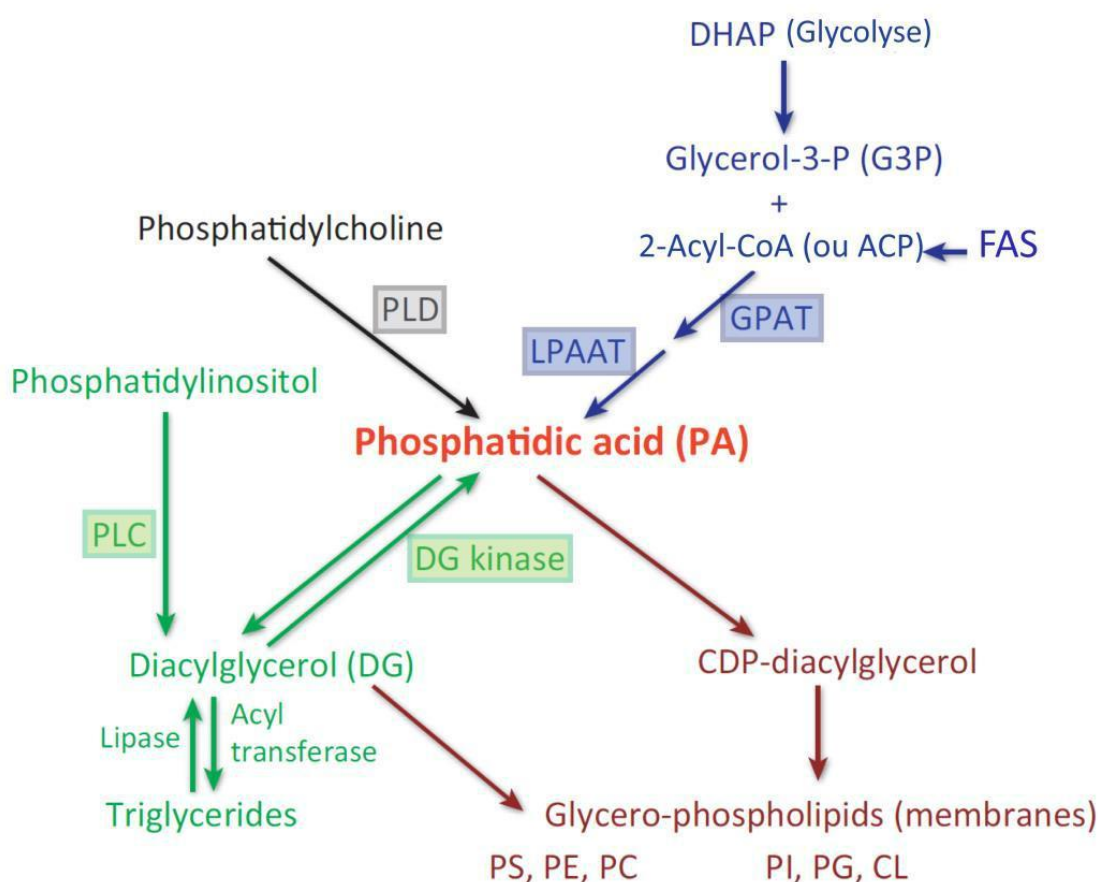


Figure 12 : Néo-synthèse et voies alternatives de synthèse des précurseurs des glycérolipides. Adaptée de Foster (2013).

i)- Voie procaryote de synthèse d’acide phosphatidique

Chez les bactéries, deux différents systèmes acyltransférases ont été décrits : le système PlsB/PlsC et le système PlsX/PlsY/PlsC (Fig. 13a) (Parsons and Rock, 2014 ; Sohlenkamp and Geiger, 2015). Le système PlsB/PlsC a été décrit en premier lieu chez *Escherichia coli* (Cooper *et al.*, 1987 ; Coleman, 1990). PlsB est une GPAT et PlsC est

une LPAAT. PlsB et PlsC sont capables de transférer un acyl-ACP issus de la voie *FASII* ou un acyl-CoA issu de la nutrition sur le G3-P (Parsons and Rock, 2014 ; Sohlenkamp and Geiger, 2015). Chez *E. coli*, la position *sn-1* est occupée par un acide gras C16:0 ou C18:1. La position *sn-2* contient principalement des acides gras insaturés C16:1 ou C18:1 (Coleman, 1990 ; Ohlrogge and Browse, 1995 ; Rock *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2004, Fig. 13a). Cependant, le double mutant *FadI/FadA* est incapable de générer des insaturations, l'acide gras C16:0 peut être alors inséré en position *sn-2* (Yao and Rock, 2013). Le système PlsX/PlsY/PlsC a été décrit chez d'autres bactéries à gram positive (Lu *et al.*, 2006) ou chez les mutant *E. coli* pour la fonction PlsB. Le mutant *EcPlsB* présente une faible affinité pour le G3-P et une croissance affectée en milieu minimum sans glycérol (Cronan *et al.*, 1974 ; Bell, 1974 ; Parsons and Rock, 2014).

PlsX permet la conversion de l'acyl-ACP en acyl-PO₄, le seul substrat susceptible d'être transféré par PlsY sur un G3-P (Fig. 13a) (Lu *et al.*, 2006 ; Parsons and Rock, 2014 ; Sohlenkamp and Geiger, 2015). Chez les plantes, la voie de synthèse du PA de type « procaryote » est localisée dans le chloroplaste. Les deux enzymes acyltransférases sont nommés ATS1 (Kunst *et al.*, 1988 ; Slabas *et al.*, 2002 ; Zhu *et al.*, 2009) et ATS2 (Bourgis *et al.*, 1999 ; Maisonneuve *et al.*, 2010 ; Kim and Huang, 2004 ; Bin *et al.*, 2004 ; Maisonneuve *et al.*, 2010). L'inactivation d'ATS1 chez les plantes conduit à une perte de la synthèse des glycérolipides, néanmoins, le mutant reste viable (Yokoi *et al.*, 1998 ; Li-Beisson *et al.*, 2010) tandis que la perte d'ATS2 chez *Arabidopsis* entraîne une embryoléthalité chez le mutant (Yu *et al.*, 2004 ; Kim and Huang, 2004). Il a été démontré dans des études ultérieures qu'ATS1 chez les plantes tolérantes au froid comme *Arabidopsis*, les épinards, les plants de pois et de courge présentent une spécificité pour les acides gras C16:0 saturé et C18:1⁹ insaturés en position *sn-1* (Bertram and Heinz, 1981 ; Weber *et al.*, 1991 ; Nishida *et al.*, 1993 ; Slabas, 2002 ; Chen *et al.*, 2011). ATS2 quant à elle incorpore exclusivement un acide gras saturé C16:0 en position *sn-2* du G 3-P (Frentzen *et al.*, 1983 ; Kim and Huang, 2004 ; Gao *et al.*, 2015). Le PA produit ainsi dans l'enveloppe interne du chloroplaste est typiquement plastidial et est principalement utilisé pour la synthèse du phosphatidylglycérol (PG) dans le même compartiment. Cette synthèse requière trois autres enzymes : CDP-DAG synthase, PG-phosphate synthase et la PG-p phosphatase (Ohlrogge and Browse, 1995 ; Li-Beisson *et al.*, 2010). La PG est le précurseur des cardiolipines qui sont les lipides majeurs des membranes mitochondriales (Frentzen *et al.*, 1983).

ii)- Voie eucaryote de synthèse d'acide phosphatidique

Le PA de structure eucaryote est synthétisé à partir d'acyl-CoA présent dans le cytosol. Il peut être issu de l'alimentation ou synthétisé depuis *FASII*. Chez les mammifères, il existe plusieurs enzymes GPATs et AGPATs. Cette synthèse peut être intégralement dans le réticulum endoplasmique ou partagée entre la membrane externe de la mitochondrie (face au cytosol) et le réticulum endoplasmique. Les GPATs indépendamment de leur localisation transfèrent généralement un acide gras C16:0, C18:0 ou C18:1 en position *sn-1* (Yamashita *et al.*, 2014). Il a été démontré que la mutation de *Gpat1* chez la souris (localisée dans la mitochondrie) induit une réduction de l'incorporation de l'acide gras C16:0 contre une augmentation de celle du C18:0 et C18:1 dans les phospholipides (Yamashita *et al.*, 2014). Cependant, la surexpression de *Gpat1* augmente de manière très importante l'incorporation du C16:0 en position *sn-1* des phospholipides mais aussi celle du C20:4 en position *sn-2* (Yamashita *et al.*, 2014). Ceci a mis en évidence l'influence de l'activité des enzymes AGPATs par la nature de l'acide gras en position *sn-1* de leur substrat (LPA).

dans la néo-synthèse *de novo* des phospholipides que dans le remodelage des lipides (pour revue Yamashita *et al.*, 2014). Toutes les AGPATs décrites chez les mammifères sont localisées dans le réticulum endoplasmique. A ce jour, il n'existe pas de localisation dans un autre compartiment cellulaire.

Chez les plantes, l'acide gras transféré par AGPAT est principalement de type insaturé C18:1 dans le réticulum endoplasmique. La mitochondrie des plantes aussi comprend une voie de synthèse du LPA via l'activité de trois GPATs (GPAT1-3) (Chen *et al.*, 2011). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a démontré à ce jour l'existence d'une seconde voie d'acétylation du LPA dans la mitochondrie via une AGPAT.

1-4 Biosynthèse du diacylglycérol

Le DAG est le substrat nécessaire à la synthèse de phosphatidylcholine (PC) et de la phosphatidyléthanolamine (PE), deux classes de phosphoglycérolipides membranaires ou structuraux (Fig. 12). Le DAG peut être converti en triacylglycérol (TAG) par une DAG acyltransférase (DAGT). Le TAG est glycérolipide neutre. Il permet le stockage d'énergie en formant des gouttes lipidiques dans la cellule. Ce TAG est généralement utilisé dans les cellules des mammifères pour reformer du DAG par hydrolyse et transacylation du TAG *via* l'activité des lipases. Le DAG est principalement formé à partir du PA *de novo* *via* l'activité des PA phosphatases (PAP) (Fig. 12). Ce DAG est alors utilisé pour la synthèse de la PC et la PE par un transfert de la choline et de l'éthanolamine du CDP-choline (CDP-Cho) et du CDP-éthanolamine (CDP-Eth), respectivement. Cette voie est nommée « la voie Kennedy ». Chez les plantes, le DAG produit par PAP est aussi utilisé en tant que précurseur unique pour la synthèse des galactolipides, les principaux constituants des membranes du chloroplaste. Les PAPs sont présentes au niveau du réticulum des cellules animales et végétales (structure eucaryote) et dans le chloroplaste des cellules végétales (structure procaryote). En plus d'être un précurseur intermédiaire pour la synthèse des lipides, le DAG est aussi un messager intracellulaire secondaire pour la réponse à plusieurs stimuli. Il est alors formé *via* l'activité des PLC sur le phosphatidylinositol (PI) et ses dérivées les phosphoinositides (PIPs) (Fig. 12). Chez les procaryotes, la synthèse du DAG *via* la

voie Kennedy est absente chez les bactérie et la synthèse des phosphoglycérolipides ne se fait que par l'intermédiaire du CDP-DAG (Kondakova *et al.*, 2015).

1-5 Biosynthèse du CDP-diacylglycérol

Le PA peut être condensé avec une cytidines triphosphate (CTP) pour former le CDP-DAG *via* l'activité d'une CDP-DAG synthase (CDS). Il existe différentes isoformes de cette enzyme avec différentes distributions tissulaires chez les animaux. Un de ces isoformes, CDS2, joue un rôle dans la voie de synthèses des lipides structuraux tandis que l'autre isoforme noté CDS1 est impliqué dans la transduction du signal. Chez les plantes aussi l'activité CDP-DAG synthase a été localisée dans plusieurs systèmes membranaires: les plastes, les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Cependant, chez la levure, il ne semble y avoir qu'une seule enzyme CDS associée entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie (Shen *et al.*, 1996). Le CDP-DAG est utilisé chez ces organismes pour principalement synthétiser le phosphatidylglycérol, les cardiolipines (CLs), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (Fig. 12), c'est la voie CDP-DAG.

2- Synthèse des phosphoglycérolipides

Rappelons que la synthèse des phosphoglycérolipides peut se faire *via* deux voies distinctes. La première est la voie Kennedy impliquant le DAG comme intermédiaire entre le PA et les phosphoglycérolipides. La seconde est la voie CDP-DAG par l'intermédiaire du CDP-DAG, lui-même directement issu du PA. Dans le cas de la voie Kennedy, c'est le groupe polaire qui est activé avec la cytidine diphosphate avant association avec le DAG, tandis que dans la voie CDP-DAG c'est le lipide qui est activé avant incorporation de la tête polaire au lipide (Fig. 14a).

2-1 Synthèse des phosphoglycérolipides par la voie CDP-DAG

Les synthèses de phospholipides dérivés du CDP-diacylglycérol sont catalysées par des enzymes capables d'utiliser un alcool, le myo-inositol par exemple, et le CDP-DAG pour former une molécule de CMP et une molécule de phospholipide. Ces voies

concernent la synthèse du PG, du phosphoglycérol phosphate (PGP), des CLs, du PI et de la PS (Fig. 14b, c et d).

i) Synthèse du phosphatidylglycérol et des cardiolipines

La synthèse du PG se fait en deux étapes (Fig. 14b) au niveau de son site de localisation finale : réticulum endoplasmique, mitochondries ou chloroplaste. La première étape consiste en la catalyse du CDP-DAG et d'une molécule G3-P par une PG-phosphate (PGP) synthase. La seconde étape consiste à déphosphoryler le PGP par une PGP-phosphatase pour générer le PG. Chez les plantes, il existe deux gènes codant pour des PGP synthases (PGP1 et PGP2) (Müller and Frentzen, 2001 ; Li-Beisson *et al.*, 2010). L'enzyme PGP1 est adressée au niveau du plaste et de la mitochondrie et elle est indispensable pour la synthèse du PG plastidial. L'enzyme PGP2 est localisée au niveau du réticulum endoplasmique (Müller and Frentzen, 2001) et elle est responsable de la synthèse du PG autre que plastidial. Il a été démontré que l'acide phosphatidique produit dans le chloroplaste par la LPAAT servait principalement à la synthèse du PG (Kunst *et al.*, 1988 ; Ohlrogge and Browse, 1995). Les cardiolipines, appelées aussi diphosphatidylglycérols, sont les phospholipides « signature » des membranes mitochondriales (Schlame and Greenberg, 2016). Ils ont une structure symétrique qui est constituée de deux acides phosphatiques reliés par glycérol. Ce lipide joue un rôle très important dans le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire dû à sa charge négative mais aussi dans l'interaction avec les protéines mitochondriales (Lu and Claypool, 2015). Chez les bactéries, les CLs participent à la formation de domaines membranaires protéines-lipides dynamiques pour augmenter la courbure membranaire au niveau des sites de division cellulaire (Kondakova *et al.*, 2015).

ii) Synthèse du phosphatidylinositol

La catalyse du CDP-DAG par la phosphatidylinositol synthase (PIS) permet de former une molécule de PI au niveau du réticulum endoplasmique (Fig. 14c). Cependant, les levures assurent cette fonction au niveau de la membrane plasmique, face au cytosol.

Le PI peut être phosphorylé à différents degrés formant alors divers phosphoinositides (PIP, PIP₂ et PIP₃). Ces molécules sont très importantes pour la transduction des

signaux cellulaires. Le PI et les phosphoinositides (PIPs) peuvent être à l'origine d'une grande majorité du DAG, *via* l'action d'une phospholipase C (voir plus haut, synthèse du DAG), issu principalement des grandes voies de signalisation du calcium intracellulaire présentes dans tous les organismes vivants. Le PI, en plus de son rôle dans la signalisation calcique, peut être la source principale d'acide arachidonique (C20:4, messenger secondaire) destiné à la synthèse des eicosanoïdes (précurseurs de nombreuses molécules inflammatoires telle que les prostaglandines) dans les cellules animales, par l'activité de plusieurs phospholipases.

iii) Synthèse de la phosphatidylsérine

La synthèse de la phosphatidylsérine (PS) par la PS synthase diffère selon si elle est générée chez les procaryotes, les animaux ou les végétaux. L'enzyme PS synthase a été étudiée dans un premier temps exclusivement chez *E. coli*. Cette enzyme est étroitement liée à la membrane et permet la catalyse d'un CDP-DAG et d'une L-sérine pour former la phosphatidylsérine. La PS joue un rôle central dans la biosynthèse des phospholipides bactériens. En effet, il a été démontré que la mutation nulle de PS synthase conduit à la réduction dramatique du niveau de PE dans la bactérie (Vance and Steenbergen, 2005 ; Kondakova *et al.*, 2015). La conversion de la PS en PE se fait par une PS carboxylase qui libère une molécule de CO₂ (Fig. 14d et e). Cette activité est aussi présente chez les plantes. Cependant, les animaux ne possèdent pas de PS synthase similaire utilisant le CDP-DAG comme substrat. Il existe toutefois deux enzymes PS synthases I et II respectivement qui permettent la conversion de la PC et PE en PS. Comme dans la voie procaryote, les animaux possèdent aussi une PS carboxylase (Vance and Steenbergen, 2005). Les plantes possèdent une PS synthase qui catalyse l'addition d'une sérine sur un CDP-DAG. Cependant, le devenir de la PS comme précurseur de la PE et de la PC n'a pas encore été clairement défini chez les plantes malgré l'identification d'une PS décarboxylase dans les membranes mitochondriales.

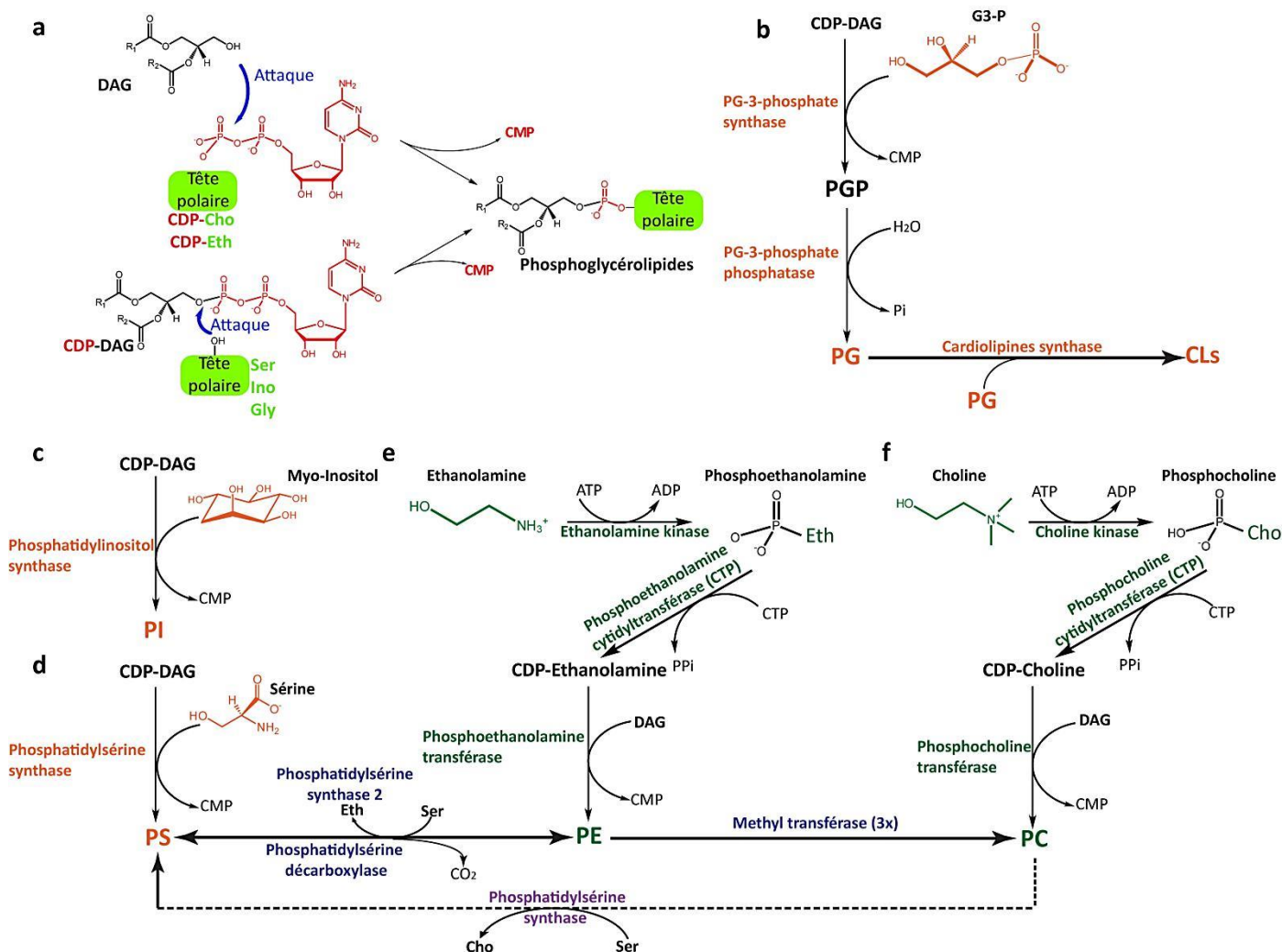


Figure 14 : Voies d'incorporation des têtes polaires des phospholipides dans les diacylglycérols. a) Illustration des deux stratégies d'incorporation des têtes polaires (vert clair) sur le squelette lipidique (DAG ou CDP-DAG). D'une part, nous avons la voie de synthèse CDP-DAG (en orange) pour (b) La synthèse *de novo* du phosphatidylglycérol (PG) et des cardiolipines (CLs) par l'intermédiaire du PG-phosphate (PGP), (c) la synthèse du phosphatidylinositol (PI) et (d) de la phosphatidylsérine (PS). D'autre part, on a la voie de synthèse des phospholipides via la voie Kennedy (vert) pour (e) la synthèse de la phosphatidyléthanolamine et (f) la phosphatidylcholine. Chez l'homme, la PS n'est produite que via la phosphatidylsérine à partir de la PE (en bleu, réaction réciproque) ou à partir du PC (en violet) avec l'activité des PS synthase. Aussi, les mammifères possèdent la méthyl transférase qui catalyse le transfert de trois groupements méthyl en trois réactions sur la PE pour former le PC. Cette illustration est adaptée de LipidMaps.

2-2 Synthèse des phosphoglycérolipides par la voie Kennedy du DAG

La voie de synthèse des phospholipides à partir de la voie Kennedy comporte trois étapes successives impliquant une aminoalcool kinase, une aminoalcool cytidyltransférase et une phosphoaminoalcool transférase (Fig. 14e et f).

i) Synthèse de la phosphatidyléthanolamine

La PE est le second phospholipide le plus abondant après la PC dans les cellules eucaryotes et le phospholipide majeur chez les bactéries (*Pseudomonas* par exemple). La synthèse de la PE peut se faire de deux façons : (i) *via* le transfert d'une molécule d'éthanolamine (Eth) sur un DAG ou (ii) *via* la décarboxylation de la PS. Chez les bactéries, la PE est exclusivement synthétisée *via* la décarboxylation de la PS (voir section : Synthèse de la phosphatidylsérine). En effet, la PS est minoritaire dans les bactéries car elle très rapidement convertie en PE (Sohlenkamp and Geiger, 2015 ; Kondakova *et al.*, 2015). Chez les animaux et les plantes, la voie majeure de synthèse *de novo* de la PE reste la voie Kennedy. Elle consiste dans un premier temps à former la CDP-Eth en deux étapes dans le réticulum endoplasmique (face cytosolique) (Fig. 14e). Une éthanolamine kinase ajoute un groupement phosphate sur une molécule d'éthanolamine et forme Eth-phosphate et une Eth-phosphate cytidiltransférase forme une CDP-Eth. Dans un deuxième temps, le *sn3*-OH du DAG *via* l'activité d'une PE transférase attaque le groupement phosphoryle de la CDP-Eth activée pour transférer l'Eth-phosphate sur le DAG et libérer ainsi une cytidilmonophosphate (CMP) formant ainsi la PE. L'absence de la PE dans la bactérie est létale. Chez les animaux et les plantes elle est embryoléthale.

ii) Synthèse de la phosphatidylcholine

La PC est le phospholipide le plus abondant dans la cellule eucaryote (environ 50%-70% des phospholipides totaux). Sa structure cylindrique fait de la PC un composant important pour l'intégrité membranaire. Tout comme la biosynthèse de PE, la PC peut aussi être synthétisée par deux voies différentes, soit par méthylation de la PE par une PE-N-méthyl transférase, soit par addition de CDP-choline sur du DAG. Contrairement aux levures, aucune activité PE N-méthyl transférase n'a été détectée chez les plantes (Fig. 14f).

II- Le PA dans la cellule

Avec une tête polaire constituée d'un unique groupement phosphate, le PA possède une structure conique. Comme décrit dans la section précédente, le PA est le précurseur

universel de la synthèse *de novo* de tous les glycérolipides nécessaires pour la biogénèse membranaire. Le PA joue aussi un rôle clé dans la transduction des signaux, le transport membranaire, le réarrangement du cytosquelette et dans l'exocytose. Cette section a pour objectif de rassembler les connaissances variées et établies à ce jour sur la fonction du PA dans la cellule. L'implication du PA dans la synthèse des glycérolipides a déjà été traitée dans la section précédente et ne sera pas présentée ici. Le PA est un phospholipide très mineur dans la cellule vivante. Son abondance cellulaire change très rapidement en fonction des conditions intra et extracellulaires incluant les stress biotiques, abiotiques ou encore la croissance et le développement cellulaire. La synthèse du PA se fait par plusieurs voies (Fig. 12). Le PA produit par la voie impliquant deux enzymes acyltransférases en assemblant les acides gras issus la synthèse *de novo* FAS est principalement utilisé pour la synthèse des glycérolipides (Fig. 12). Le PA issus des voies impliquant des phospholipases joue généralement le rôle d'un messager secondaire dans la cellule vivante.

1- Le PA et la signalisation cellulaire

Dans la cellule végétale, la principale source du PA pour cette fonction est l'hydrolyse des phospholipides membranaires par une phospholipase D (PLD) (Fig. 12 et 15a). Il existe 12 enzymes avec une activité PLD chez le modèle végétal *Arabidopsis thaliana* et 17 enzymes chez le riz (*Oriza sativa*, McLoughlin and Testerink, 2013). Chacune de ces enzymes a des spécificités sélectives pour différents substrats. Ceci illustre de la complexité de ces voies de signalisation/synthèse. Dans un premiers temps, les enzymes PLD ont été classées dans deux catégories selon leur extension N-terminal de liaison aux lipides :

- Un motif d'homologie Pleckstrin (pleckstrin homology (PH)) et un motif d'homologie PHOX (phox-homology (PX))
- Un motif de liaison aux lipides dont l'activité dépend du calcium (C2) (McLoughlin and Testerink, 2013).

Les domaines PH et PX sont impliqués aussi dans la liaison aux phosphoinositides. Dans un deuxième temps, les enzymes PLD ont été classées selon leurs homologies et leurs activités enzymatiques : 5 classes (α - β - γ - δ - ϵ) chez *A. thaliana* possédant une

extension N-terminal avec les motifs PH et PX et une classe (ζ) avec un motif C2 (McLoughlin and Testerink, 2013). PLD α hydrolyse la PC, PE et PG, PLD β hydrolyse principalement la PC et la PS et PLD γ hydrolyse de préférence la PE et un autre lipide dérivé, la N-acylphosphatidyléthanolamine (NAPE). Ce lipide est une PE avec un troisième acide gras sur le groupement amine de l'éthanolamine. De plus, les classes PLD β et PLD γ requièrent la présence des phosphoinositides pour leur activité contrairement à PLD α (Pappan *et al.*, 1998). Ces différentes classes de PLD sont actives en fonction des conditions de l'environnement intra- et extracellulaire. Certains isoformes PLD α sont ainsi actives en réponse aux espèces réactives à l'oxygène (ROS), en réponse à l'acide abscissique (ABA) et en réponse au froid par hydrolyse de la PC. Les isoformes PLD γ sont impliqués dans le développement des racines en réponse à la déshydratation et au stress salin (Anthony *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2010 ; Testerink and Munnick, 2011 ; McLoughlin and Testerink, 2013). Une intéressante étude sur le stress salin a démontré aussi l'implication d'une PLD α chez *A. thaliana* en réponse à ce stress. Il a été prouvé que la forte teneur en sel activait PLD α pour la production du PA au niveau de la membrane. Ce PA se lie à une protéine associée aux microtubules MAP65-1. Cette association augmente l'activité de MAP65-1 pour la polymérisation et le regroupement des microtubules au niveau de la membrane plasmique modifiant ainsi le cytosquelette de la cellule pour s'adapter au stress salin (Zhang *et al.*, 2012). Le rôle de PLD dans la modification du cytosquelette a aussi été prouvé chez le tabac. En effet, il a été démontré que PLD β est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine lors de la formation du tube pollinique (Pleskot *et al.*, 2010). Dans la cellule animale, deux isoformes PLD ont été identifiés : PLD1 et PLD2, ils sont associés préférentiellement et respectivement à la membrane interne de la cellule et à la membrane plasmique. PLD1 est localisée au niveau des régions synaptiques neuronales, des régions de translocation de la membrane plasmique de la cellule. PLD1 régule positivement l'exocytose dépendante à PIP2 dans les cellules neurosécrétrices (Rohrbough and Broadie, 2005). Cette voie de synthèse du PA est requise pour l'activité mTOR (mammalian target of rapamycin). Il a été démontré que le PA se lie spécifiquement au domaine de liaison de la rapamycine FKBP12 sur mTOR, de manière compétitive avec la rapamycine (Foster, 2010). Il existe deux complexes mTOR dans la cellule (mTORC1 et mTORC2) qui sont les principaux senseurs de la quantité de nutriments disponibles pour la cellule ainsi que du statut énergétique nécessaires à la division cellulaire (Foster, 2010).

La production du PA est alors critique pour l'assemblage des complexes mTOR car une perturbation de la liaison du PA aux complexes mTOR est embryolétale (Gangloff *et al.*, 2004 ; Guertin *et al.*, 2006 ; Foster, 2013). Par ailleurs, dans les cellules cancéreuses, l'activité PLD est élevée et elle est importante pour la survie de ces cellules qui sont très sensibles à la suppression des activités PLD et mTOR en condition de restriction nutritive (Gadir *et al.*, 2008 ; Foster, 2013). Ainsi, les cellules cancéreuses semblent compenser le manque de lipides exogènes par plus de production de PA intracellulaire via PLD pour maintenir l'activité mTOR intacte.

Une autre source de PA consiste à l'hydrolyse du PI et dérivés en DAG via l'activité des PI-phospholipases C (PI-PLC) (Fig. 12 et 15a) et le DAG et PA via l'activité de l'enzyme DAG-kinase (DGK). Les PLC possèdent un domaine PH comme celui identifié dans les PLD mais qui est exclusif à la liaison aux phosphoinositides. Chez la plante modèle *A. thaliana*, il existe 9 PI-PLC et 7 DGK. Cette voie de synthèse du PA impliquant *AtPLC1* pour l'hydrolyse du PI-phosphate (PIP₃) peut être activée par la salinité en parallèle à la voie PLD α (Munnick *et al.*, 2000 ; Testerink and Munnick, 2011) et par la sécheresse. Cette voie est aussi requise pour l'inhibition de la germination et l'expression de gènes induites par l'hormone ABA (Sanchez and Chua, 2001 ; Testerink and Munnick, 2011). La voie PLC-DGK est impliquée aussi dans la résistance aux infections fongiques et divers pathogènes (Vossen *et al.*, 2010 ; Testerink and Munnick, 2011). Dans la cellule animale, il existe cinq isoformes PI-PLC (β , ϵ , ζ , γ et δ) et c'est le DAG qui est considéré comme un potentiel messenger. La conversion du DAG en PA ainsi permet l'arrêt de la signalisation *via* le DAG. En effet, l'activité de PI-PLC permet la libération d'une molécule de DAG qui reste liée à la membrane et d'une molécule d'inositol-phosphate (IP et ses dérivés phosphorylés). L'IP, principalement IP₃ se diffuse dans le cytosol et se lie à des récepteur IP₃ tel que les canaux calciques ce qui augmente le niveau du calcium intracellulaire. Ceci engendre des changements dans la signalisation et les activités intracellulaires. Chez la drosophile, l'accumulation de l'IP suite à une activité accrue de PLC par un signal lumineux conduit à une dégénération du système visuel au niveau de la rétine de la mouche (LaLonde *et al.*, 2005). Le flux de Ca²⁺ augmente dans la cellule à cause de l'ouverture du canal calcique ce qui entraîne une dépolarisation rapide des membranes. Cette dépolarisation persiste en même temps que le signal lumineux. Cependant, l'étude a démontré l'augmentation

de l'activité des PLD dans cet état de potentiel instable qui permet de maintenir un niveau stable de PIP2 qui est le substrat de PLC (LaLonde *et al.*, 2005). Chez les mammifères, la voie de production du PA via PLC est aussi impliquée dans la réaction inflammatoire. La liaison des agonistes tel que le collagène sur les récepteurs des plaquettes peut activer les PLC au niveau membranaire libérant ainsi l'acide arachidonique C20:4 à partir du PI membranaire. Cette libération du C20:4 induit la synthèse des anti-inflammatoires comme la prostaglandine. La libération de l'acide arachidonique se fait par hydrolyse du PA au niveau membranaire par une autre famille de phospholipases, phospholipases A (PLA). Les PLA coupent les liaisons ester entre les acides gras et les phospholipides (Fig. 15a).

En résumé, la synthèse du PA par les phospholipases présente un mécanisme cellulaire très complexe et coopératif dans le remodelage des phospholipides et il est impliqué dans de nombreuses fonctions intra et extracellulaires. Les produits des phospholipases sont ainsi des composants très importants dans plusieurs voies de signalisation cellulaire (Fig. 15b).

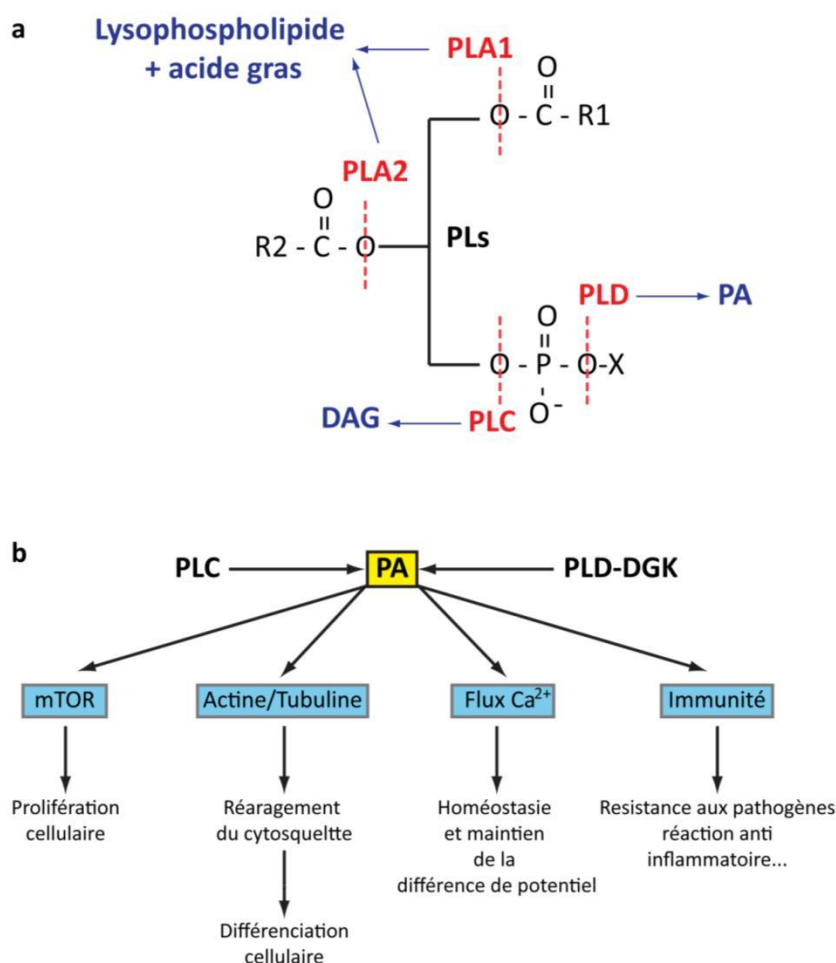


Figure 15 : Implication du PA dans la signalisation cellulaire via l'activité des phospholipases. a) Action des différentes phospholipases sur les phospholipides (PLs). X= correspond à une tête polaire. **b)** représentation très simplifiée résumant le rôle du PA dans la signalisation cellulaire.

2- Le PA, la courbure membranaire et le transport membranaire

Les membranes biologiques contiennent une importante proportion de lipides anioniques et sont de ce fait chargées négativement. Par exemple, les phospholipides constituant le feuillet interne de la membrane plasmique chez les mammifères, sont principalement la PS et le PI (Fig. 16). Cette charge négative est importante, voire déterminante pour la structure et la fonction des membranes en promouvant l'interaction avec les domaines chargés positivement des protéines cytosoliques et transmembranaires. L'interaction entre ces domaines et les lipides anioniques de la membrane peut faciliter l'insertion et l'orientation de ces protéines. L'acide phosphatidique est un lipide anionique. La petite tête polaire du PA constituée uniquement d'un groupement phosphate lui confère une structure en forme de cône

(Fig. 16a) qui peut être accentuée par les acides gras polyinsaturés. Cette forme conique dans les membranes déclenche une courbure négative (Kooijmann *et al.*, 2003 ; Kooijmann *et al.*, 2005, Fig. 16). Le PA n'est pas le seul phospholipide ayant la capacité de modifier la structure de la bicouche lipidique qui constitue les membranes (Fig. 16a). Le DAG favorise aussi la courbure négative de la bicouche lipidique tandis que les lysophospholipides, LPA ou LPC par exemple, favorisent les courbures positives de la membrane (Fig. 16a). Ces phénomènes permettent de faciliter la fusion et la fission membranaire. Dans plusieurs études, le rôle du PA a été reporté dans la fission membranaire des organites, comme la mitochondrie ou l'appareil de Golgi, la formation des vésicules synaptiques, le transport lipidique, l'endocytose et l'exocytose. Lors de ces phénomènes le PA est essentiel. En plus de sa structure conique, il joue le rôle d'une ancre lipidique pour le recrutement des protéines effectrices. En effet, Kooijman and Burger (2009) ont révélé que la charge négative du PA maintenue grâce à sa tête polaire comprenant un phosphomonoester (Fig. 16b) favorise la liaison aux résidus lysine (Lys) et arginine (Arg) des protéines et jouant ainsi un rôle très important dans la liaison spécifique aux effecteurs et le recrutement des protéines (Kooijman *et al.*, 2003 ; Kooijman and Burger, 2009 ; Shin and Loewen, 2011). Parmi les effecteurs se liant au PA, on trouve les dynamines (Burger *et al.*, 2000 ; Shin and Loewen, 2011) et les clathrines (Antonescu *et al.*, 2010, Fig. 16c). Les dynamines sont des protéines associées aux clathrines et sont impliquées dans la formation des vésicules lors de l'endocytose. Une autre protéine impliquée dans la fission et l'endocytose c'est l'endophiline. L'assemblage de cette protéine au niveau des vésicules requière la présence du PA au niveau membranaire (Schmidt *et al.*, 1999 ; Gallop *et al.*, 2005, Fig. 16c). La formation de ces vésicules de fission ou fusion implique un remodelage géométrique des deux feuilletts de la bicouche lipidique. Dans le cas de l'exocytose, le PA est tout aussi important. Ces dernières années, plusieurs études ont mis en évidence la machinerie de régulation du transport vésiculaire médié par le PA formé *via* l'activité PLD (Fig. 16c et d). Il a été démontré que la translocation du glucose stimulée par l'insuline *via* un transporteur GLUT4 dépend de l'activité PLD sur GLUT4 (Huang *et al.*, 2005). GLUT4 est présent sur des vésicules intercellulaires et en présence d'une forte concentration de glucose dans l'environnement externe des cellules, ces vésicules sont envoyées vers la membrane plasmique par une exocytose. La fusion de la membrane plasmique à ces vésicules permet ainsi l'intégration de GLUT4 au niveau de la membrane plasmique. Ainsi, Huang *et al.* (2005) ont démontré que l'augmentation de

l'activité PLD conduisait à une accumulation du PA, une augmentation de l'exocytose et ainsi plus d'absorption de glucose *via* GLUT4 (Huang *et al.*, 2005, Fig. 16d). Par ailleurs, la fusion des membranes dépend d'un complexe appelé SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptors). Ce complexe est constitué d'un ensemble de protéines en majorité transmembranaires. L'acheminement et l'efficacité de la fusion dépend de deux types de SNARE, des SNAREs reliés aux vésicules (v-SNAREs) et d'autres reliés à la membrane cible (t-SNARE ; t pour targe=cible) (Rohrbough and Broadie, 2005, Fig. 16d). Afin que le complexe SNARE se forme à partir des v-SNAREs et t-SNAREs, la membrane cible doit modifier sa structure. Autrement dit, le feuillet la membrane interne doit maintenir une courbure positive tandis que le feuillet de la membrane externe maintient une courbure négative. Chez les levures, ce mécanisme aussi a été bien décrit (Nakanishi *et al.*, 2004 ; pour revue dans Ganesan *et al.*, 2015). Le PA a été décrit comme essentiel pour la sporulation de *S. cerevisiae*. La sporulation est un évènement équivalent à la gamétogénèse chez les levures et requiert la formation de nouveaux compartiments membranaires appelés les prospores (Nakanishi *et al.*, 2006). PLD est la principale source de PA lors de cet évènement qui permet le recrutement du SNARE appelé Spo20 chez *S. cerevisiae* (Nakanishi *et al.*, 2004 ; Nakanishi *et al.*, 2006, Fig. 16d). Spo20 est localisé dans le noyau dans les conditions de croissance normales. Lors de la méiose, Spo20 subit une translocation, médiée par une liaison au PA, vers la membrane plasmique afin de permettre la fusion des vésicules pour la formation des prospores membranaires (Nakanishi *et al.*, 2004 ; Nakanishi *et al.*, 2006). Spo20 est décrit comme un senseur exclusif pour le PA. Cependant, il a été démontré qu'en cas de modification du pH intracellulaire, la liaison des effecteurs et senseurs au phosphomonoester du PA est déstabilisée par les cations présents dans le cytosol, tel que le Ca^{2+} par exemples (Kooijman *et al.*, 2003). L'acidification du cytoplasme par Ca^{2+} engendre une inactivation des PLD *via* une phosphorylation par des protéines kinases C (PKC) ce qui stabilise le niveau du PA au niveau des membranes engendrant un arrêt de la sécrétion et de l'endocytose (Cazzolli *et al.*, 2006 ; Kooijman and Burger, 2009 ; Shin and Loewen, 2011 ; Ganesan *et al.*, 2015). Un autre mécanisme de transport lipidique est décrit chez les plantes par le groupe de Benning. Ils ont alors, mis en évidence l'implication du PA dans le transport des lipides *via* des interactions entre le PA et les protéines de transport (Benning, 2009). D'abord, il a été démontré que la liaison du PA à un transporteur des lipides ABC (acyl-binding carier) constitué d'un homodimère de

trois protéines trigalactosyldiacylglycérol TGD1 TGD2 et TGD3 (Xu *et al.*, 2005 ; Awai *et al.*, 2006 ; Roston *et al.*, 2012). Ce complexe est situé au niveau de la membrane interne du chloroplaste et se lie exclusivement au PA *via* TGD2 permettant sa translocation de la membrane externe vers la membrane interne du chloroplaste pour la synthèse des galactolipides (Awai *et al.*, 2006 ; Benning 2009). Ensuite, il a été démontré que l'interaction d'un autre transporteur ABC constitué d'un homodimère de la protéine TGD4 avec le PA, permet la translocation de ce lipide du réticulum endoplasmique vers le chloroplaste (Benning, 2009 ; Wang *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2013). Cette interaction est assurée par des résidus Arg formant une boucle cytosolique dans la région N-terminal de la protéine TGD4 (Wang *et al.*, 2013, Fig. 16b). Cette translocation du PA du réticulum endoplasmique vers la membrane interne du chloroplaste est essentielle pour la synthèse des galactolipides (Fig. 13b). Enfin, une très récente étude a mis en évidence le rôle du PA lors du transport des galactolipides du réticulum endoplasmique vers le chloroplaste *via* une mono et digalactosyldiacylglycérol (M-DGDG) synthase MGD1 et DGD1, respectivement. Cette étude a démontré que l'activité de DGD1 au niveau de la membrane externe du chloroplaste nécessite une interaction avec le PA (Kelly *et al.*, 2016). La synthèse des galactolipides se fait à partir des précurseurs provenant du chloroplaste et du réticulum endoplasmique synthétisés *via* la voie Kennedy (Fig. 13b). L'interaction entre la région N-terminale de DGD1 et du PA a permis *in vitro* de former des liposomes à partir de la fusion de petites vésicules unilamellaires suggérant que ce phénomène peut aussi se produire *in vivo* (Kelly *et al.*, 2016). En résumé, le schéma proposé par cette étude implique un transport des précurseurs eucaryotes du réticulum endoplasmique peut être *via* des transporteurs lipidiques tels que TGD1, TGD2, TGD3 et TGD4. Les précurseurs eucaryotes et procaryotes (provenant du chloroplaste) sont alors utilisés pour la synthèse des galactolipides dans un premier temps *via* MGD1 au niveau de la membrane interne du chloroplaste. Le monogalactosyldiacylglycérol est dans un deuxième temps utilisé par DGD1 *via* l'interaction au PA pour la formation du digalactosyldiacylglycérol (DGDG). Le PA se lie à la DGD1 permettant l'ancrage et la mobilisation de l'enzyme sur la membrane interne et externe du chloroplaste ce qui peut faciliter le transfert du MGDG et DGDG à travers les membranes du chloroplaste (Kelly *et al.*, 2016).

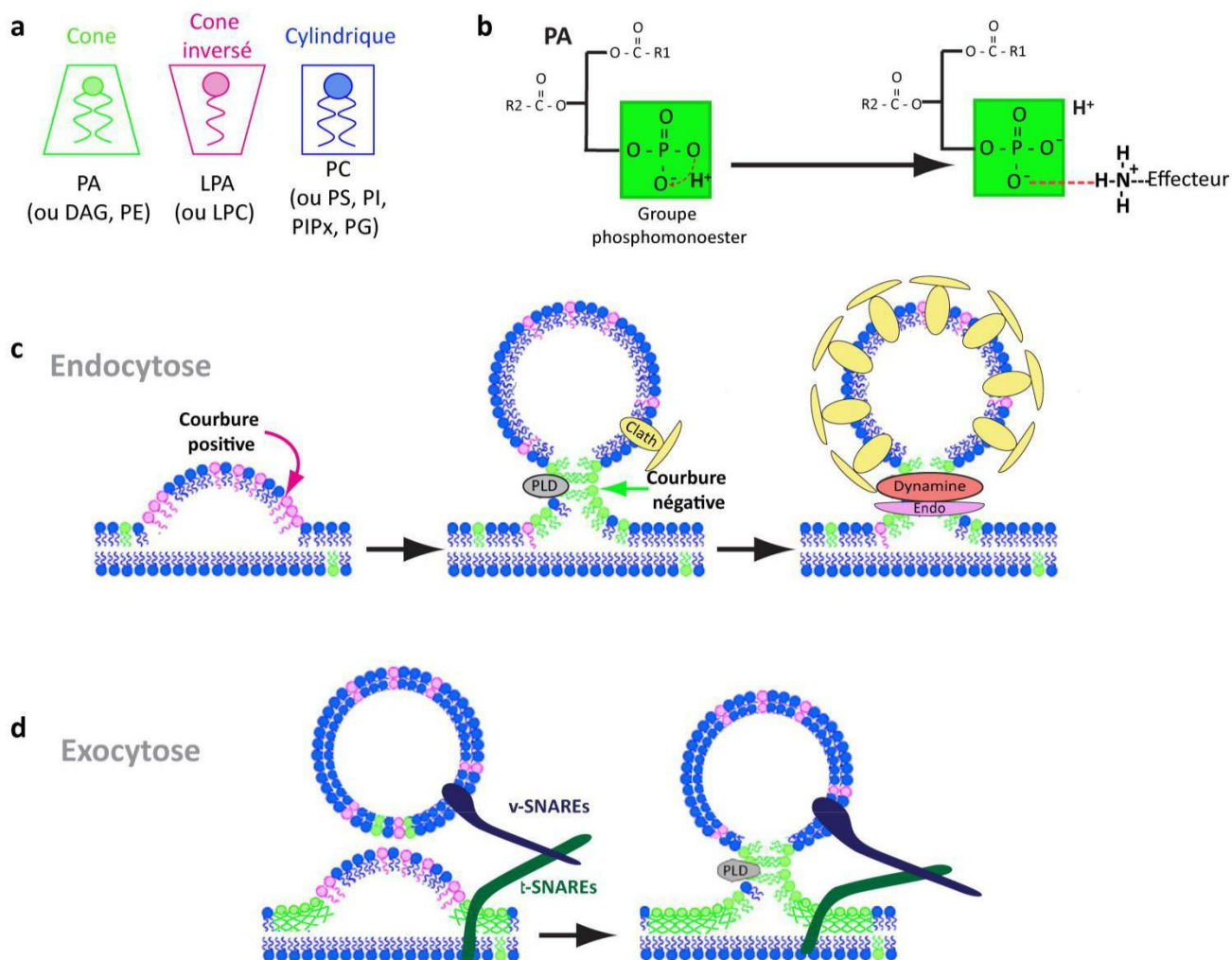


Figure 16 : Rôle du PA dans la courbure membranaire et l'interaction aux effecteurs. **a)** Les différentes formes géométriques des phospholipides influant la structure de la bicouche lipidique. **b)** Le groupement phosphomonoester du PA responsable de l'interaction avec les protéines effectrices par une libération d'un proton générant deux charges négatives sur le PA. Ces charges peuvent alors interagir avec les résidus positifs des protéines, la Lys et l'Arg *via* leur groupement NH_3 . **c)** Illustration simplifiée du rôle du PA au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique lors de l'endocytose de gouttelettes lipidiques, pour la génération des courbures négative de la membrane permettant ainsi le recrutement des protéines impliquées dans la fission vésiculaire : les clathrines (Clath) la dynamine et l'endophiline (Endo). **d)** Illustration simplifiée du rôle du PA lors de l'exocytose médié par PLD. La présence du PA au niveau de la membrane cible favorise l'encrage des t-SNARE à cet endroit ce qui simplifie l'interconnexion entre la membrane de la vésicule et de la membrane cible. (c) et (d) sont adaptées de Guijas *et al.* (2014).

Chapitre 3 : Synthèse et dynamique des acyl-lipides chez les Apicomplexa

I- Les lipides chez les parasites *Apicomplexa* : Que connaissons-nous à ce jour ?

Durant le développement intracellulaire des tachyzoïtes, de nombreux organites et systèmes membranaires ayant chacun une composition et une homéostasie lipidique unique sont mis en place. Ceci inclue (i) le système endomembranaire « classique des eucaryotes », le noyau, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, la membrane plasmique, (ii) les organites semi-autonomes issus des phénomènes d'endosymbiose, la mitochondrie et l'apicoplaste et (iii) une série d'organites spécifiques aux Apicomplexa et /ou *Toxoplasma gondii* dont la nature et la biogénèse restent encore à déterminer, tels que les organites sécrétoires spécifiques : les micronemes, les rhoptries et les granules denses, des compartiments plus atypiques : les acidocalcisomes, une vacuole de type végétal, le complexe pelliculaire (PPM et IMC) et la membrane de la vacuole parasitophore. Afin de répondre au besoin en lipides membranaires lors de la division, *T. gondii* a mis en place un système complexe qui reflète de son histoire évolutive et combine la synthèse *de novo* et le recyclage des lipides détournés de la cellule hôte. Dans cette section, je ferai un état des lieux des connaissances relatant des sources et synthèses de lipides. Les voies de synthèses des acides gras et des lipides seront traitées en parallèle des voies de détournement de lipides de la cellule hôte chez les parasites *Apicomplexa* mais plus particulièrement chez *T. gondii*.

1- Les acides gras : sources et devenir

Historiquement, les parasites *Apicomplexa* étaient considérés comme incapables de synthétiser *de novo* leurs propres acides gras et dépendaient uniquement de la cellule hôte pour s'en fournir. Cependant, la découverte de l'apicoplaste, un plaste vestigial non-photosynthétique issu de l'endosymbiose secondaire d'une algue rouge, (Fig. 6b) a remis en question cette hypothèse. En effet, le chloroplaste des plantes et des algues n'a

pas uniquement la photosynthèse comme fonction exclusive mais possède d'autres fonctions clés dont la voie procaryote de synthèse des acides gras, *FASII*. Cette fonction a été conservée dans l'apicoplaste des parasites *Apicomplexa* au cours de l'évolution, voir chapitre 1 (II. 2). Les gènes codant pour les différentes enzymes impliquées dans la voie *FASII* ont été identifiés chez *Plasmodium spp.*, *T. gondii* et *Eimeria tenella* -un autre parasite *Apicomplexa*- (Waller *et al.*, 1998 ; Ralph *et al.*, 2004 ; Ferguson *et al.*, 2007). Cependant, *Cryptosporidium*, un *Apicomplexa* responsable de la cryptosporidiose ayant perdu l'apicoplaste au cours de son évolution, est donc incapable de la synthèse des acides gras via *FASII* et dépend uniquement de la voie *FASI* et des élongases. Sachant que cette voie est absente dans les cellules mammifères, elle constitue une potentielle cible pour le développement thérapeutique.

1.1. Synthèse *de novo* des acides gras via les voies *FAS*

Depuis sa découverte, de nombreuses études sont alors menées afin de déterminer l'implication de *FASII* lors du développement intracellulaire des *Apicomplexa*, principalement chez *Plasmodium spp.* et *T. gondii*. L'importance de *FASII* a été mise en évidence la première fois en traitant les parasites par des inhibiteurs bactériens tel que le Triclosan (Waller *et al.*, 1998 ; McLeod *et al.*, 2001 ; Surolia and Surolia, 2001). Cet inhibiteur se lie spécifiquement à l'enzyme énoyl-ACP réductase (ENR, Fig. 9a) de la voie *FASII* bactérienne codée par le gène *FabI*. Cette liaison forme un complexe très stable ENR-NAD⁺-Triclosan bloquant ainsi la dernière étape de synthèse des acides gras (Fig. 9). Le traitement par Triclosan des souris infectées par *P. berghei*, atténue drastiquement la croissance du parasite *in vivo* et indiquait la suppression totale des phases intra-érythrocytaires symptomatiques de la malaria chez des souris infectées (Surolia and Surolia, 2001). Le complexe *Pf*ENR-NAD⁺-Triclosan de la voie *FASII* durant le stade sanguin de *P. falciparum* réduit la synthèse des acides gras (Surolia and Surolia, 2001 ; Perozzo *et al.*, 2002 ; Freundlich *et al.*, 2007). Ces études suggéraient donc l'importance de cette voie durant le stade sanguin du parasite et donc sa valeur potentielle en tant que nouvelle cible du traitement de la malaria. Cependant de nombreuses études et équipes ont tentés de répéter les expériences permettant d'éradiquer les stades sanguins du parasite par traitement au Triclosan mais sans succès (Baschong *et al.*, 2011). Les manipulations génétiques des différentes enzymes impliquées dans *FASII* ont permis par la suite de démontrer que *FASII* n'est pas

nécessaire durant le stade sanguin. En effet, les mutants nuls par double recombinaison homologue des gènes *FabZ*, *FabB/F* ou encore *FabI* de la voie *FASII* (Fig. 9a) chez *P. falciparum* et *P. yoelii* n'affectent pas la propagation du parasite en stade sanguin (Yu *et al.*, 2008 ; Vaughan *et al.*, 2009). Cependant, l'importance de l'enzyme a été reportée dans ces mêmes études lors de la division des organites et des parasites au cours de la schizogonie en fin du stade hépatique de *P. berghei* et *P. yoelii* (Yu *et al.*, 2008 ; Vaughan *et al.*, 2009). Et plus récemment, il a été démontré que la délétion du gène *fabI* chez *P. falciparum* entraîne l'arrêt du développement et de la division parasitaire au cours de la schizogonie sporozoïtaire dans les moustiques en plus d'un effet délétère au niveau de la schizogonie hépatocytaire comme sur le modèle murin (van Schaijk *et al.*, 2014). Chez *P. berghei* et *P. yoelii*, la *FASII* est facultative pour le développement des parasites murins dans le moustique (Yu *et al.*, 2008 ; Vaughan *et al.*, 2009, Tableau 2). Ceci nous indique une importante différence dans la régulation et l'activation de la voie *FASII* chez les parasites humains et murins. Chez *T. gondii*, *FASII* est vitale pour le parasite durant le stade tachyzoïte intracellulaire. Le traitement par Triclosan du parasite ou la mutation d'ACP ont mis en évidence l'effet drastique de la perturbation de *FASII* chez *T. gondii* (McLeod *et al.*, 2001 ; Mazumdar *et al.*, 2006 ; Martins-Duarte *et al.*, 2016). Le mutant inductible Δ ACP/iACP par l'anhydrotétracycline présente des défauts dans le développement du parasite mais surtout dans la ségrégation de l'apicoplaste. L'apicoplaste étant vital, les parasites filles dépourvus d'apicoplaste ne peuvent survivre à la mutation ACP (Mazumdar *et al.*, 2006 ; Martins-Duarte *et al.*, 2016). Dans une récente étude, il a aussi été observé que la perturbation de *FASII*, par les deux méthodes, bloque la dernière étape de l'endodyogénie qui se traduit par un arrêt de la cytokinèse et un défaut de maturation de la pellicule membranaire (Martins-Duarte *et al.*, 2016). Ainsi, l'importance de cette voie dans l'apicoplaste lors des stades de division massive des *Apicomplexa* (tachyzoïtes pour *T. gondii*, hépatique pour *P. berghei* et *P. yoelii* et moustique pour *P. falciparum*) fait de la voie *FASII* une cible intéressante pour le développement de médicaments spécifiques au parasites.

La protéine centrale autour de laquelle s'organise la voie *FASII* est l'ACP (Fig. 9a). L'ACP est transférée sur un groupement malonyl-CoA ou acétyl-CoA en prenant la place du Coenzyme A pour initier *FASII*. L'acétyl-CoA peut être généré à partir de l'acétate par une acyl-CoA synthase ou à partir du pyruvate par une pyruvate déshydrogénase (PDH) et une acétyl-CoA carboxylase (ACC). L'ACCase est une

enzyme indispensable au niveau de l'apicoplaste car, l'acétyl-CoA généré dans le cytosol ne peut pas traverser les membranes (Ralph *et al.*, 2004). Une ACCase a été localisée au niveau de l'organite et elle est uniquement impliquée dans la voie *FASII* (Jelenska *et al.*, 2001 ; Bisanz *et al.*, 2006). Dans le plaste, PDH est un complexe constitué de quatre sous unités (E1 α , E1 β , E2 and E3). Ce complexe semble être acquis de la cyanobactérie ancestrale à l'origine des plastes (Ralph *et al.*, 2004). Ces sous-unités ont été identifiées et localisées au niveau de l'apicoplaste de *T. gondii* et *Plasmodium spp.* (Foth *et al.*, 2005 ; Crawford *et al.*, 2006 ; Pino *et al.*, 2007 ; Pei *et al.*, 2010). L'étude de ces sous unités a révélé l'absence d'effet de la perturbation du complexe PDH au niveau des stades sanguins *P. falciparum*, *P. berghei* et *P. yoelii*, similairement à la voie *FASII* (Pei *et al.*, 2010 ; Cobbold *et al.*, 2013). De même, l'effet des mutations du complexe PDH présentent un phénotype similaire aux mutants *FASII* chez *P. berghei* et *P. yoelii* en stade hépatique et *P. falciparum* en stade moustique (Nagel *et al.*, 2013 ; Cobbold *et al.*, 2013). Ceci suggère que la synthèse des acides gras dans l'apicoplaste dépend de la formation de l'acétyl-CoA génère à partir du pyruvate *via* l'activité du complexe PDH. Le pyruvate quant à lui est issu de la glycolyse (Ramakrishnan *et al.*, 2012). Cependant, un seul transporteur de glucose (GT1) a été décrit chez *T. gondii* au niveau de la membrane plasmique et celui-ci ne semble pas essentiel au développement intracellulaire du parasite (Pomel *et al.*, 2008 ; Blume *et al.*, 2009). Cela signifie que la glycolyse ne se produit pas dans l'apicoplaste mais que les produits de cette réaction peuvent être transportés dans l'apicoplaste. Cette hypothèse a été confirmée par l'identification d'un transporteur de phosphoénolpyruvate PEP (apicoplast phosphate transporter, APT) vers le stroma de l'apicoplaste homologue au transporteur phosphate du chloroplaste des plantes (Mazumdar *et al.*, 2006 ; Mullin *et al.*, 2006 ; Banerjee *et al.*, 2012). Ce transporteur est putativement impliqué dans la translocation du PEP depuis le cytosol par un mécanisme d'antiport phosphate. Chez *P. berghei* et *P. falciparum* deux APT distincts sont identifiés dont l'un est localisé au niveau de la membrane externe et le second au niveau de la membrane interne de l'apicoplaste et respectivement nommés iTPT et oTPT, pour inner et outer triose phosphate transporter (Mullin *et al.*, 2006 ; Banerjee *et al.*, 2012). Par ailleurs, les TPT présentent une forte affinité pour le PEP et le dihydroacétone phosphate, un autre triose phosphate issu de la glycolyse qui peut servir de substrat pour la synthèse du glycérol 3-phosphate (*via* une glycérol phosphate déshydrogénase *TgGpdA*) nécessaire à la synthèse des précurseurs lipidiques dans l'apicoplaste (Lim *et al.*, 2009 ; Amiar *et al.*,

2016). En revanche, *T. gondii* possède un unique APT observé par imagerie en microscopie électronique et serait localisé au niveau des différentes membranes de l'apicoplaste (Fleige *et al.*, 2007 ; Karnataki *et al.*, 2007). Le PEP est ensuite converti en pyruvate par une pyruvate kinase (PK). Chez *Plasmodium spp.* et *T. gondii* deux isoformes ont été identifiés PKI et PKII. PKI est prédite étant une protéine cytosolique et PKII est localisée au niveau du stroma de l'apicoplaste (Fleige *et al.*, 2007 ; Saito *et al.*, 2008).

En résumé, l'apicoplaste est complètement autonome pour la synthèse de ses propres acides gras à partir du PEP transporté vers le stroma jusqu'à la dernière étape d'élongation de la voie *FASII* passant par l'approvisionnement en acide lipoiique nécessaire pour l'activité du complexe PDH (voir Chapitre 1.I.2) (Fig. 17). La compréhension du déroulement de cette voie a permis la mise en évidence de l'importance vitale de *FASII* dans l'apicoplaste lors des stades de division massive du parasite (tachyzoïtes pour *T. gondii*, hépatique pour *P. berghei* et *P. yoelii* et moustique pour *P. falciparum*) impliquant une importante quantité de lipides pour assurer la ségrégation de l'apicoplaste même et la formation des nouvelles cellules filles. Cependant, le lien entre la synthèse des acides gras et celle des lipides reste encore inconnu.

FASII n'est pas l'unique voie de synthèse d'acides gras chez les *Apicomplexa*. Plusieurs parasites possèdent les gènes codant pour les différentes sous-unités du complexe homodimère *FASI*, *Cryptosporidium*, *Eimeria* et *Toxoplasma*. Les connaissances actuelles sur cette voie sont limitées à *Cryptosporidium parvum* où le complexe *FASI* a été localisé dans le parasite intracellulaire avec une structure périnucléaire et en structure ponctuée dans le sporozoïte libre (Zhu *et al.*, 2000 ; Zhu, 2004). Les analyses biochimiques de *CpFASI*, a permis d'identifier deux domaines acyl-CoA synthase ACS1 et ACS2. ACS1 a une affinité de liaison aux acides gras à chaînes longues (à partir du C10) et ACS2 à une forte affinité pour les acides gras à chaînes très longues (jusqu'à C30) (Zhu, 2004). Ces résultats suggèrent que le complexe *CpFASI* serait impliqué dans l'élongation et non pas dans la synthèse *de novo* des acides gras. L'architecture de *CpFASI* étant similaire à celle de *Toxoplasme* et *Eimeria* suggérant que cette enzyme doit avoir le même rôle dans ces deux parasite (Lu *et al.*, 2007 ; Ramakrishnan *et al.*, 2013). *Plasmodium* semble en revanche, ne pas posséder de voie

FASI et il dépend certainement de la cellule hôte (globule rouge) pour s'approvisionner en acides gras depuis le sérum environnant durant le stade sanguin (Botté *et al.*, 2013).

Tableau 2 : Résumé des données expérimentales sur les enzymes impliquées dans la voie FASII chez les Apicomplexa. Adapté de Shears *et al.* (2015). Pf : *Plasmodium falciparum*, Pb : *Plasmodium berghei*, Py : *Plasmodium yoelii*, Tg : *Toxoplasma gondii*, Et : *Eimeria tenella* ; M : stade moustique, H : stade hépatique, S : Stade sanguin.

Enzymes	Localisation				Activité				Mutants						
	Pf	Pb	Py	Tg	Et	Pf	Pb	Py	Tg	Et	Pf	Pb	Py	Tg	Et
Transporteur Phosphate de la membrane externe de l'apicoplast (ATP)	✓			✓		✓			✓					✓	
Transporteur Phosphate de la membrane interne de l'apicoplast (ATP)	✓	✓				✓									
Pyruvate kinase (PKII)	✓			✓					✓						
Pyruvate dehydrogenase (PDH)	✓		✓	✓							✓	✓	H		
Acétyl-CoA carboxylase (ACC)	✓			✓					✓		✓				
Malonyl-CoA-aCP transacylase (FabD)					✓	✓				✓					
Acyl carrier protein (ACP)	✓	✓	✓	✓										✓	
β-ketoacyl-ACP synthase III (FabH)	✓					✓									
β-ketoacyl-ACP synthase I/II (FabB/F)						✓					✓	✓	H		
β-ketoacyl-ACP réductase (FabG)			✓			✓									
β-hydroxyacyl-ACP déshydratase (FabZ)				✓		✓		✓					✓	H	
Enoyl-ACP réductase (FabI)	✓	✓	✓	✓	✓	✓					✓	✓	H		

Voie de synthèse FASII des acides gras

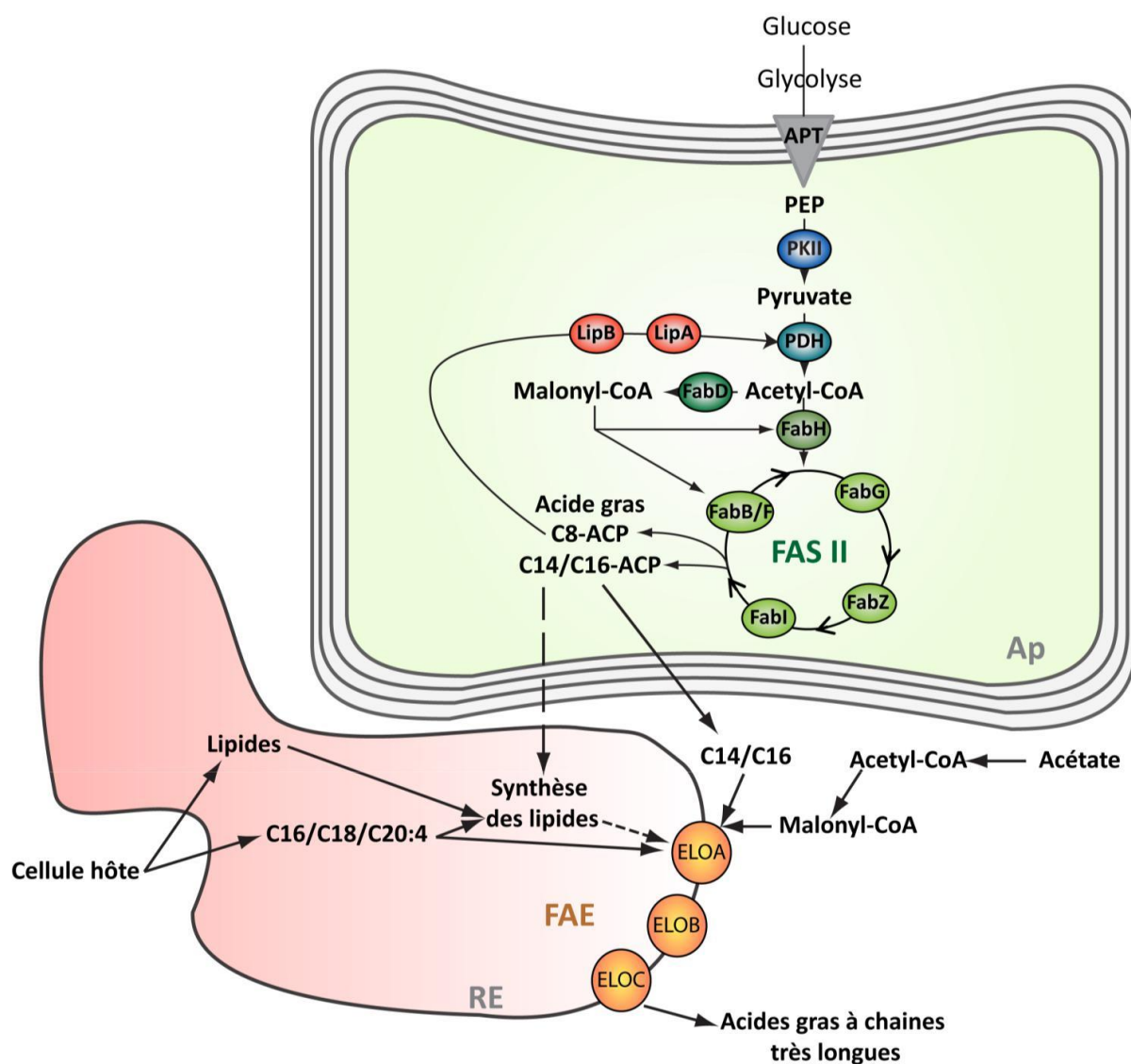


Figure 17 : Les parasites *Apicomplexa* possèdent un réseau complexe pour combiner la synthèse *de novo* et le remodelage des acyl-lipides. Ap : apicoplaste, RE : réticulum endoplasmique, LipA/LipB : lipoyl synthases.

1.2. Elongation des acides gras synthétisés *de novo*

La voie d'élongation des acides gras (fatty acid elongation *FAE*) est considérée comme le troisième mécanisme de synthèse des acides gras chez les *Apicomplexa* (Fig. 17). Toutes les cellules eucaryotes possèdent une voie *FAE* localisée au niveau du réticulum endoplasmique. En 2007, *Cryptosporidium parvum* fut le premier *Apicomplexa* à être rapporté comme possédant la voie *FAE* via l'activité d'une enzyme élongase unique *LCE1* (long chain longase 1). Cette enzyme est localisée au niveau de la membrane

plasmique du sporozoïtes libre. Dans le parasite intracellulaire, *CpLCE1* est localisée au niveau de la membrane de la vacuole parasitophore du parasite intracellulaire suggérant que l'enzyme utilise certainement des substrats issus de la cellule hôte. De plus, l'analyse biochimique de la protéine recombinante a montré une préférence pour les acides gras C14:0 et C16:0 et les principaux produits serait le C16:0 et C18:0. LCE1 est alors capable d'utiliser l'acide myristique comme substrat et effectuer jusqu'à deux réaction d'élongation pour former l'acide stéarique comme produit final (Fritzler *et al.*, 2007). Contrairement à *C. parvum*, la voie *FAE* chez *T. gondii* est localisée au niveau du RE et elle est constituée de trois enzymes Elo-A, Elo-B et Elo-C bien caractérisées (Ramakrishnan *et al.*, 2012 ; Ramakrishnan *et al.*, 2015). Le marquage du métabolisme lipidique par des substrats spécifiques marqués aux isotopes stables du carbone (^{13}C) et l'analyse lipidique ont révélé que l'apicoplaste est responsable de la synthèse des acides gras à chaîne longue C14:0 et C16:0. Le C16:0 est le principal substrat de *TgElo-A* pour la synthèse du C18:0 par l'addition de 2C. *TgEloB* et *TgElo-C* synthétisent du C22:1 jusqu'à C26:1 en utilisant exclusivement des acide gras mono-insaturés comme substrat, dont le substrat initial est le C18:1. Ces enzymes *TgElo* utilisent préférentiellement les acides gras issus de la voie *FASII* de l'apicoplaste et ont des activités successives ce qui signifie que *TgElo-C* utilise principalement comme substrat le C22:1 généré par *TgElo-B*. De ce fait, Ramakrishnan *et al.* (2012) ont noté l'absence de phénotype chez les simples mutants pour l'une des enzymes Elo chez *T. gondii* tandis que la mutation de plusieurs Elo était létale. Ceci est expliqué par un chevauchement de la spécificité au substrat des trois enzymes (Ramakrishnan *et al.*, 2012). Cependant, la perturbation d'une des enzymes impliquées dans chacun des cycles d'élongation, énoyl-CoA réductase (ECR) par exemple, (Fig. 10) résulte dans un important défaut de croissance chez le mutant avec une accumulation des acides gras à chaînes longues et réduction des espèces PI et PE avec des acides gras à chaînes longues et très longues mono et poly-insaturés (Ramakrishnan *et al.*, 2015). Une fois de plus, cette étude confirme l'importance des acides gras issus de *FASII* et leur modification dans la synthèse lipidique nécessaire pour la survie de *T. gondii* intracellulaire. En effet, Bisanz *et al.* (2006), ont pu démontrer que les acides gras issus de *FASII* entraînent dans la composition de majeures classes lipidiques : PC, PE, PS, PI, PG, DAG, TAG et les sphingolipides. Dans cette étude, l'acétate été considéré comme le précurseur de la voie *FASII* et utilisé sous sa forme radioactive pour identifier les lipides utilisant les acides gras produits par *FASII*. Aujourd'hui on sait que l'acétate fournit le malonyl-CoA

entrant dans la voie *FAE* et non pas dans *FASII* (Ramakrishnan *et al.*, 2012). Ainsi, les acides gras issus de *FASII* et *FAE* rentrent dans la composition des lipides majeurs constituant les membranes biologiques. Cependant, à ce jour, comment ces acides gras sont incorporés dans les lipides chez les *Apicomplexa* restent mal connus.

1.3. Import des acides gras de la cellule hôte

Les *Apicomplexa* sont aussi capables d'importer les acides gras depuis la cellule hôte (Mazumdar *et al.*, 2004). Chez *T. gondii*, l'import des acides gras à partir de l'environnement externe se fait dans le tachyzoïte extracellulaire et intercellulaire (Charron and Sibley, 2002). L'utilisation d'acides gras marqués à un fluorophore (BODIPY) permettant de visualiser le lipide d'intérêt en microscopie, a permis d'observer l'accumulation des acides gras C4-C9-BODIPY dans des corps lipidiques dans les parasites extracellulaires. Le parasite extracellulaire présente une voie *FASII* complètement inactive (MacRae *et al.*, 2012) ceci pourrait expliquer ce stockage massif des acides gras exogènes. Lors de l'infection des cellules hôtes, le marquage se diffuse plus dans le cytosol du parasite avec la réduction du nombre des corps lipidiques (Charron and Sibley, 2002 ; Quittnat *et al.*, 2004). Toutefois, quand *T. gondii* infecte des cellules pré-marquées au C4C9-BODIPY, la fluorescence des acide gras n'est noté qu'au niveau de la zone pelliculaire et ne pénètre pas dans le parasite, néanmoins pas juste après l'invasion. De plus, *T. gondii* est capable aussi d'utiliser ces acides gras pour la synthèse *de novo* des lipides. En effet, l'addition de l'acide acétique (C2) ou l'acide butyrique (C4) radio-marqués, a permis de les détecter ultérieurement par technique de chromatographie sur couche mince, principalement au niveau de la PC (Charron and Sibley, 2002). Ainsi, il a été démontré que *T. gondii* incorpore préférentiellement l'acide palmitique C16:0 mais aussi l'acide oléique C18:1, l'acide stéarique C18:0, l'acide linoléique C18:2 et l'acide arachidonique C20:4 (Quittnat *et al.*, 2004). De plus, les études récentes sur la voie *FASII* et la voie *FAE*, ont révélé que le parasite déficient de l'une de ces deux voies est capable de compenser partiellement ou complètement les défauts de croissance par un import des substrats depuis le milieu de culture. Une telle complémentation du milieu de culture avec les acides gras à chaîne longue (C14:0 et C16:0) a permis de compenser le blocage de *FASII* par le Triclosan, et les acides gras à très longues chaînes saturés ou mono-insaturés (C18-C24) et la complémentation des mutants de la voie *FAE* (Martins-Duarte *et al.*, 2015 ; Ramakrishnan *et al.*, 2015). Ainsi,

ces résultats mettent en évidence la capacité de *T. gondii* d'ajuster l'incorporation des acides gras exogènes, leur stockage et utilisation pour la synthèse *de novo* des phospholipides, selon son mode de vie et ses besoins.

2- Les phosphoglycérolipides : synthèse, remodelage et destination

Les membranes biologiques des *Apicomplexa* sont constituées principalement de plusieurs classes de phosphoglycérolipides (PLs) dont la PC est le majeur PLs commun entre *Plasmodium*, *T. gondii* et *Babesia* (Florin-Christensen *et al.*, 2000 ; Vial *et al.*, 2003 ; Welti *et al.*, 2007, Tableau 3).

La synthèse *de novo* des phospholipides chez les *Apicomplexa* est étudiée depuis quelques années. Chez *P. falciparum*, le métabolisme de synthèse des PLs a été démontré par analyse biochimique. Ainsi, il a été décrit que la synthèse de la PC peut se faire selon différentes voies (Fig. 18). L'enzyme PC-transférase (CEPT : Cho/Eth phosphotransférase) permet le transfert de la choline du CDP-Cho sur le DAG *via* la voie Kennedy (Fig. 14, 18) et a été décrite chez *Plasmodium* (Déchamps *et al.*, 2010a ; revue : Ramakrishnan *et al.*, 2013). La CEPT utilise la CDP-Cho ou la CDP-Eth comme substrat pour la formation de la PC et la PE au niveau du réticulum endoplasmique (Vial *et al.*, 1984 ; Vial *et al.*, 2003 ; Déchamps *et al.*, 2010b). Il n'a pas été possible d'obtenir des mutants pour cette activité, ni pour les activités choline kinase (CK) ni pour la phosphocholine cytidyltransférase (CTP) suggérant l'importance de la voie Kennedy de la PC chez *Plasmodium* (Déchamps *et al.*, 2010b). La CK et la CTP sont localisées dans le cytoplasme du parasite (Alberge *et al.*, 2010 ; Déchamps *et al.*, 2010b). Cette localisation a été confirmée par une étude très récente par des inhibiteurs de la CK (Serrán-Aguilera *et al.*, 2016). Les inhibiteurs BR23 et BR25 bloquent spécifiquement *Pf*CK et entraînent un arrêt du développement du parasite en stade sanguin (trophozoite). L'analyse biochimique des phospholipides a révélé une importante déficience dans la synthèse de la PE (Serrán-Aguilera *et al.*, 2016). Ce résultat mis en évidence la double activité de *Pf*CK pour la phosphorylation de la choline et l'éthanolamine démontrant que la majorité de la PE produite dans le parasite dépend de cette voie. La PC peut être formée aussi à partir de la sérine chez *Plasmodium* (Elabbadi *et al.*, 1997 ; Déchamps *et al.*, 2010a). Ce substrat subit dans un

premier temps, une décarboxylation pour former l'éthanolamine et libérer une molécule de CO₂ par une serine décarboxylase (Fig. 18). Dans un deuxième temps, l'éthanolamine est phosphorylée, possiblement par la CK, afin de générer la phosphoéthanolamine avant une triple réaction de méthylation formant ainsi la phosphocholine *via* l'activité d'une phosphoéthanolamine N-méthyltransférase (Déchamps *et al.*, 2010b, Fig. 18). L'enzyme phosphoéthanolamine N-méthyltransférase chez *P. falciparum* est uniquement responsable de la méthylation d'un substrat phosphoéthanolamine au niveau de l'appareil de Golgi et ne peut être active sur l'éthanolamine seule ou la PE (Ramakrishnan *et al.*, 2013, chapitre 2 II, 2.2 et Fig. 14). Chez *T. gondii*, cette activité est absente (Gupta *et al.*, 2005). Cependant le parasite est capable de la synthèse de la PC *via* l'activité de la CK qui a été récemment confirmée et localisée dans des structures ponctuelles dans le parasite (Gupta *et al.*, 2005 ; Sampels *et al.*, 2012). L'obtention d'un mutant nul pour cette activité n'a pas abouti suggérant l'importance de cette enzyme pour le développement du parasite. Mais, la tentative d'un mutant inductible a permis l'identification de deux isoformes de la CK chez *T. gondii* dont l'activité peut être complémentaire voir compensatrice (Sampels *et al.*, 2012).

La synthèse *de novo* de la PE par la voie Kennedy dans le cytosol a déjà été prouvée chez les différentes espèces de *Plasmodium* et confirmée encore très récemment (Déchamps *et al.*, 2010a ; Déchamps *et al.*, 2010b ; Serrán-Aguilera *et al.*, 2016). L'activité PE-transférase est assurée par l'enzyme CEPT en commun avec la synthèse de la PC chez ces parasites (Déchamps *et al.*, 2010a ; Déchamps *et al.*, 2010b). L'inactivation de cette enzyme chez *P. berghei* a été tentée sans résultat. Les auteurs en ont conclu que l'activité enzymatique était probablement essentielle, suggérant l'importance de cette enzyme pour la synthèse de la PE et la PC en stade sanguin (Déchamps *et al.*, 2010b). Serrán-Aguilera *et al.* (2016) ont démontré que la CK est aussi responsable de l'addition du phosphate sur l'éthanolamine en plus de la choline (voir paragraphe plus haut). Chez *T. gondii*, la synthèse de la PE est initiée dans le cytosol du parasite pour former la phosphoéthanolamine (Gupta *et al.*, 2005). Cependant, contrairement à ce qui a été décrit dans Charron and Sibley (2002), l'activité d'une phosphoéthanolamine N-méthyl transférase n'a pas pu être détectée par le marquage des PLs en utilisant des précurseurs radioactifs (Gupta *et al.*, 2005). Ceci suggère fortement l'absence de cette activité chez *T. gondii*. Par ailleurs, la PS

décarboxylase est considérée comme le principale activité pour la formation de la PE chez *T. gondii* (Gupta *et al.*, 2005). La synthèse de la PS a été rapportée chez plusieurs espèces *Plasmodium* (Déchamps *et al.*, 2010a). Lors de l'infection des globules rouges, *Plasmodium* utilise la sérine de la cellule hôte comme substrat pour la synthèse de la PS via l'activité PS synthase (Elabbadi *et al.*, 1997 ; Déchamps *et al.*, 2010a). De plus, l'utilisation d'une sérine radioactive a permis de détecter une activité PS décarboxylase par la formation de molécules d'éthanolamine, PE et PC radioactives (Elabbadi *et al.*, 1997 ; Déchamps *et al.*, 2010a) faisant de la sérine un précurseur important pour la formation de la PE et la PC. Chez *T. gondii*, l'activité PS synthase (PSS) est aussi présente. *TgPSS* est soluble, localisée dans les granules denses chez le parasite extracellulaire et chez la vacuole parasitophore pour le parasite intracellulaire (Gupta *et al.*, 2012). Cependant aucune activité sérine décarboxylase n'a été détectée, ce qui signifie que la PS est le principal substrat pour la formation de la PE et la PC via PS décarboxylase (Ramakrishnan *et al.*, 2013).

La synthèse du PI a été détectée aussi bien chez *Plasmodium* en stade sanguin que chez *T. gondii* (Séron *et al.*, 2000 ; Wengelnik and Vial, 2007). Chez les différentes espèces de *Plasmodium*, il n'existerait qu'une seule activité PI synthase tandis que *T. gondii* en possède deux. L'activité de ces deux PI synthases a été confirmée chez la levures déficiente pour cette enzyme suggérant une équivalent fonctionnelle entre les enzymes de *T. gondii* et celle des eucaryotes (Séron *et al.*, 2000 ; Ramakrishnan *et al.*, 2013). Il a été prouvé que *P. falciparum* est non seulement capable de récupérer de l'inositol de la cellule hôte pour la génération du PI mais aussi capable de la synthèse *de novo* de-myoinositol, absent chez *T. gondii* (MacRae *et al.*, 2014, Fig. 18). Le PI généré à partir de myo-inositol synthétisé *de novo*, est le seul destiné à la formation des glycoposphoinositides nécessaires pour le développement du parasite durant le stade sanguin. Ceci constitue l'ensemble des données disponibles sur la synthèse du PI chez les *Apicomplexa* qui reste encore peu étudié malgré l'importance de cette classe lipidique. Les connaissances sont plus fournies concernant la synthèse des dérivés phosphatés du PI, les phosphoinositides (PIP). Ils sont formés par différentes kinases qui ajoutent un ou plusieurs groupements phosphates sur la tête polaire du lipide, l'inositol, formant, le PIP, PIP₂ ou le PIP₃. L'emplacement du phosphate peut être en position 3, 4 ou 5 de l'inositol. C'est ensuite en fonction de la spécificité de la kinase que sera ajouté

le groupement phosphate. Par exemple, une PI 3-kinase (PI3k), ajoute un phosphate en position 3 de l'inositol formant le PI(3)P. Chez *P. falciparum*, l'activité PI(4)P 5-kinase catalysant le transfert d'un groupement phosphate sur un PI(4)P en position 5, et l'activité PI3-kinase ont été décrites pour former le PIP(4,5)P₂ et le PI(3)P, respectivement (Leber *et al.*, 2009 ; Tawk *et al.*, 2010). L'activité PI(4)P 5-kinase est dépendante du facteur ADP-ribosylation (Leber *et al.*, 2009). L'ADP-ribosylation a pour fonction la régulation du transport vésiculaire et le remodelage des filaments d'actine. Une PI(4)P 5-kinase a aussi été décrite chez *Eimeria maxima* et semble être très conservée chez l'ensemble des *Apicomplexa* (Goh *et al.*, 2011). L'activité PI3K a été localisée au niveau de la membrane de la vacuole digestive et l'apicoplaste de *P. falciparum*. La perturbation génétique et chimique de l'activité PI3K a permis de mettre en évidence son importance pour le développement intracellulaire de *P. falciparum* et *P. berghei* en stade sanguin (Tawk *et al.*, 2010). Chez *T. gondii*, une PI3K a été identifiée et localisée au niveau du réticulum endoplasmique. Cependant le produit de cette enzyme, le PI(3)P, est enrichi au niveau de l'apicoplaste (Tawk *et al.*, 2011). L'altération de cette activité induit un défaut dans la biogénèse de l'apicoplaste conduisant à une mort retardée des tachyzoïtes intracellulaires indiquant l'importance de PI(3)P synthétisé *de novo* pour *T. gondii* (Tawk *et al.*, 2011). Ces données ont d'ailleurs mis en évidence un des mécanismes non canoniques permettant l'adressage de vésicules vers la membrane la plus externe de l'apicoplaste. Cependant le mécanisme d'adressage en soi reste encore à être élucidé à ce jour.

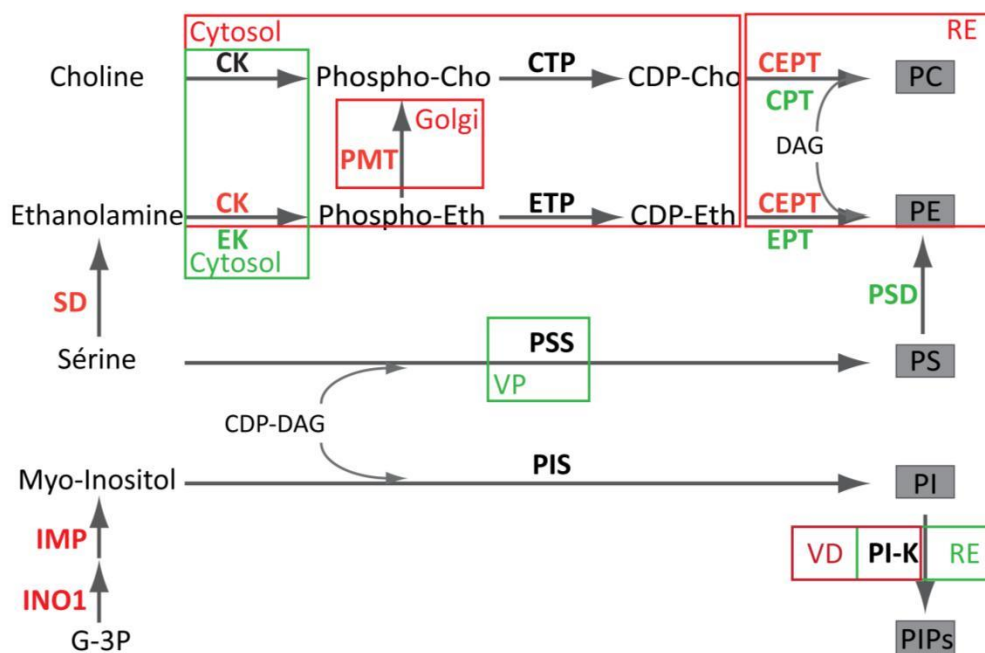


Figure 18 : Représentation des connaissances actuelles sur la synthèse des phospholipides, établies expérimentalement chez *P. falciparum* (rouge) et *T. gondii* (vert). Les voies communes sont indiquées en noir et gras. Les encadrés indiquent la localisation de la voie chez chacun des parasites. CK : choline kinase, CTP : phosphocholine cytidyltransférase, CEPT : choline/éthanolamine phosphotransférase, CPT : choline phosphotransférase, EK : éthanolamine kinase, EPT : phospho éthanolamine cytidyltransférase, EPT : éthanolamine phosphotransférase, PMT : phosphoéthanolamine N-méthyltransférase, SD : sérine décarboxylase, PSD : phosphatidylsérine décarboxylase, PSS : phosphatidylsérine synthase, INO1 : inositol 3-phosphate synthase, IMP : inositol monophosphatase, PIS : phosphatidylinositol synthase, PI-K : phosphoinositol kinase, RE : réticulum endoplasmique, VP : vacuole parasitiphore, VD : vacuole digestif, RE : réticulum endoplasmique.

Les dernières classes de PLs sont le PG et les CLs. Ces deux classes sont étroitement liées du fait de leur structure : les CL correspondent à 2 molécules de PG reliées par un glycérol. Plusieurs protéines sont prédites avec des similarités de séquence avec les PG-phosphate synthase « type eucaryote » et des CL-synthases « type procaryotes » chez *Plasmodium*, *Theileria* et *Toxoplasma* (Ramkrishnan *et al.*, 2013). Cependant, aucune étude expérimentale n'a été réalisée à ce jour pour confirmer la synthèse de PG et des CLs chez les *Apicomplexa*. Leur présence ont tout de même été confirmées chez *T. gondii* et *P. falciparum* (Wolti *et al.*, 2007 ; Botté *et al.*, 2013). A noter que les CL sont

la classe lipidique signature des membranes mitochondriales eucaryotes mais ceci n'a toujours pas été prouvé expérimentalement chez les *Apicomplexa*.

Tous ces résultats confirment la capacité des parasites *Apicomplexa* à synthétiser *de novo* les phospholipides et leurs précurseurs, nécessaires à leur développement intracellulaire. Néanmoins, ils sont capables de récupérer ces éléments de la cellule hôte et combinent l'ensemble dans un réseau très complexe pour l'intégration de ces phospholipides lors de la biogénèse membranaire, l'homéostasie lipidique et la compartimentation du parasite. En effet, la composition lipidique des différentes membranes dans une cellule est spécifique à chaque compartiment cellulaire selon sa fonction. Les lipidomes des *Apicomplexa* et de leurs organites restent peu connus dues notamment aux contraintes techniques pour la purification subcellulaire et technologiques pour définir des lipidomes totaux exhaustifs. Cependant, ces données sont essentielles et attendues pour essayer de comprendre l'origine et les flux de lipides entre le parasite et l'hôte ainsi qu'à l'intérieur du parasite. Les paragraphes suivants résument les connaissances actuelles dans ce domaine.

La membrane plasmique est semi perméable et possède une certaine rigidité afin d'assurer la stabilité et la protection de la cellule. Cette rigidité lui est conférée grâce à sa composition en acides gras saturés ou mono-insaturés. Elle est constituée d'un mélange de phospholipides, sphingolipides et de cholestérol assurant une certaine épaisseur de la membrane. Les membranes des mitochondries sont constituées d'une importante quantité de PG et CLs jouant un rôle important dans la structure et la fonction des nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique mitochondrial.

La quantité de PLs des globules rouges infectées avec *Plasmodium*, est six-fois supérieure à celle des PLs dans les globules rouges non infectées (Vial *et al.*, 2003). Les principaux PLs enrichies sont la PC, la PE et le PA. La PC constitue 40-50 % des PLs totaux de *P. falciparum* et la PE 35-45%.(Vial *et al.*, 2003). Le PI est aussi affecté par cette augmentation et constitue 4-11% des PLs totaux tandis que la PS et la SM constituent seulement 5%. Concernant *T. gondii*, l'analyse lipidique a révélé un enrichissement en PC, 60-75% des lipides totaux, suivie de la PE plus de 10%, la PS 6-8% et le PI 6% (Foussard *et al.*, 1991 ; Gupta *et al.*, 2005 ; Welte *et al.*, 2007). L'analyse de ces classes lipidiques a démontré une importante quantité d'acides gras saturés ou

mono-insaturés incorporés dans ces PLs (Welti *et al.*, 2007). Dans le tachyzoïte, les acides gras les plus abondants sont l'acide oléique > acide palmitique > acide stéarique > acide myristique ainsi que l'acide linoléique (Foussard *et al.*, 1991 ; Besteiro *et al.*, 2008, Tableau 3).

Une fraction enrichie en membrane pelliculaire de *T. gondii* a été analysée et présente une importante quantité de PC et de PS, 75% et 12% des PLs totaux, respectivement (Foussard *et al.*, 1991). Elle est constituée aussi de PE à 7%, du PI à 5.5% et SM à 1% des phospholipides totaux de la pellicule. Les principaux acides gras constituant les PLs de la pellicule de *T. gondii* sont :

- La PC : acide stéarique>acide palmitique>acide myristique>acide oléique
- La PE : acide stéarique>acide palmitique>acide oléique>acide linoléique>acide arachidonique
- La PS : acide palmitique>acide stéarique>acide oléique>acide arachidonique
- La PI : acide palmitique>acide oléique>acide stéarique>acide linoléique >acide arachidonique >acide myristique.

Les membranes de certains organites ont aussi été analysées comme les rhoptries de *T. gondii* et l'apicoplaste de *P. falciparum* (Besteiro *et al.*, 2008 ; Botté *et al.*, 2013). Les rhoptries sont constituées principalement de PC (60%), SM (20%) et PE (10% des PLs totaux). Ils sont enrichies en acide gras saturés : l'acide palmitique>acide stéarique>acide myristique>acide arachidique suivis d'acides gras mono-insaturés : acide oléique>acide palmétoléique et de l'acide linoléique (Besteiro *et al.*, 2008). L'analyse d'une fraction enrichie en apicoplaste a mis en évidence l'importante quantité d'acides gras saturés constituant les différentes membranes plastidiales : acide stéarique >acide palmitique (Botté *et al.*, 2013). Les membranes de l'apicoplaste sont composées d'une importante quantité de PC et PE qui est similaire à celle détectée dans le parasite entier. Cependant, il semble que les membranes de l'apicoplaste soient plus enrichies en PI(36 :1, 36,2 et 36 :3) et en cholestérol (Botté *et al.*, 2013).

Tableau 3 : Composition en acides gras et en phospholipides de *P. falciparum* (Pf) et *T. gondii* (Tg) entiers, des rhoptries et de la pellicule de *T. gondii* et de l'apicoplaste de *P. falciparum*. Les acides gras indiqués dans le tableau représentent les quatre classes les plus abondantes pour chacun des phospholipides. * : indique le diacyde de chaque PLs, PT : PLs totaux, -- : non déterminé (Foussard *et al.*, 1991 ; Vial *et al.*, 2003 ; Gupta *et al.*, 2005 ; Welti *et al.*, 2007 ; Ramakrishnan *et al.*, 2012 ; Botté *et al.*, 2013 ; Ramakrishnan *et al.*, 2015 ; Gulati *et al.*, 2016).

Acides gras majeurs ^{PT} parasite entier (Pf/Tg)	Acides gras majeurs ^{PT} Rhoptries (Tg)	Classes PLs	Parasite entier		Pellicule		Apicoplaste	
			% (Pf/Tg)	Acides gras majeurs (Tg)	% (Tg)	Acides gras majeurs	% (Pf)	Acides gras majeurs
C18:0/C18:1	C16:0	PC	50/62	C30:0*	75	C18:1	45	C34:1*
C18:1/C16:0	C18:1			C34:1*		C16:0		C36:2*
C16:0/C18:0	C18:0			C36:2*		C14:0		C34:2*
C20:4/C14:0	C18:2			C32:1*		C18:0		C34:0*
C18:2/C16:1	C14:0	PE	45/11	C36:2*	6.9	C18:1	30	C34:1*
C20:0/C18:2	C16:1			C34:1*		C16:0		C36:1*
C22:1/C20:1	C20:0			C34:2*		C18:0		C36:2*
C24:0/C20:4	C20:1			C36:3*		C18:2		C34:0*
C20:3/C20:0		PS	5/8	C36:2*	12	C16:0	1	C36:1*
C22:1/C22:6				C36:1*		C18:0		C36:2*
C24:1/C20:3				C34:1*		C18:1		C34:1*
C14:0/C24:0				C40:6*		C20:4		C38:3*
--/C18:3		PI	11/6	C30:0*	5.5	C16:0	15	C36:2*
--/C20:2				C34:1*		C18:1		C36:1*
--/C20:5				C36:2*		C18:0		C36:3*
--/C24:1				C32:1*		C18:2		C38:3*
--/C22:0		PG	--	--	--	--	4	C34:1*
--/C22:1				--		--		C36:2*
		PA	--/1	--	--	--	--	C36:3*
		SM	5/1.5	--	1	C16:0	2	C34:1*
				--		C18:0		C42:2*
				--		C14:0		C42:3*
						C18:1		C42:1*

Contexte et objectifs de l'étude

Mon projet de thèse s'est inscrit dans le cadre global portant sur l'étude de la fonction de l'apicoplaste dans le métabolisme lipidique chez les parasites *Apicomplexa*. Je me suis plus particulièrement intéressée à la voie de synthèse de l'acide phosphatidique au niveau de l'apicoplaste qui relie les acides gras synthétisés *de novo* via *FASII* et la synthèse des phosphoglycérolipides membranaires.

Lorsque j'ai commencé mes travaux de doctorat, nous disposions de très peu d'informations concernant la synthèse de l'acide phosphatidique chez les *Apicomplexa*. Cependant, il a été établi que *T. gondii* était capable de récupérer de l'acide phosphatidique exogène et de l'utiliser pour la synthèse des phospholipides, principalement la PC (Charron and Sibley, 2002). En 2004, Santiago *et al.* avaient démontré pour la première fois, que le réticulum endoplasmique abrite la première étape de synthèse de l'acide phosphatidique *via* l'activité d'une glycérol 3-phosphate acyltransférase (*PfGapt*) chez *P. falciparum*. Cette enzyme catalyse l'acylation d'un glycérol 3-phosphate en position sn-1 par un acide gras C16:0 ou C16:1 préférentiellement, pour former l'acide lysophosphatidique (LPA) (Santiago *et al.*, 2004).

L'étude du génome de *T. gondii* et *P. falciparum* annotés sur les bases de données ToxoDB.com et PlasmoDB.com, respectivement, nous a permis d'identifier deux gènes codant pour l'activité glycérol 3-phosphate acyltransférase (GPAT : TGGT1_270910 et TGGT1_256980; PF3D7_1318200 et PF3D7_1212500) et deux gènes codant pour l'activité *sn*-acylglycérol 3-phosphate acyltransférase (AGPAT : TGME49_297640 et TGME49_240860 ; PF3D7_0914200 et PF3D7_1444300) chez les deux parasites. PF3D7_1212500 correspond à *PfGapt* décrite précédemment (Santiago *et al.*, 2004). Cette analyse suggérait que *T. gondii* et *P. falciparum* possèderaient deux voies distinctes de synthèse de l'acide phosphatidique. Ainsi l'objectif de mon doctorat consistait à identifier la voie de synthèse de l'acide phosphatidique localisée dans l'apicoplaste de *T. gondii*.

Mon homologue en Australie, Melanie Shears, avait pour objectif d'identifier et étudier la voie de synthèse de l'acide lysophosphatidique chez *P. falciparum* et *P. berghei*

(Shears *et al.*, 2016). Ainsi, j'avais un objectif secondaire qui consistait à identifier l'étape suivante pour la synthèse de l'acide phosphatidique chez *P. falciparum*. Au cours de mon doctorat, d'autres études sont apparues sur l'étude de la synthèse de l'acide phosphatidique. Lindner *et al.* (2014) ont démontré la présence d'une activité GPAT au niveau du réticulum endoplasmique chez *P. yeolii* confirmant ainsi les observations ultérieures chez *P. falciparum* (Santiago *et al.*, 2004 ; Lindner *et al.*, 2014). Par ailleurs, ils avaient aussi démontré la présence d'une activité GPAT dans l'apicoplaste (PyapiG3PAT) et une activité AGPAT dans le réticulum endoplasmique (PyLPAAT) de *P. yeolii*. Cependant, aucune activité AGPAT n'a été détectée dans l'apicoplaste de ce parasite (Lindner *et al.*, 2014).

Plus récemment encore, une autre étude a mis en évidence le rôle de l'acide phosphatidique dans la sécrétion des micronèmes chez *T. gondii* (Bullen *et al.*, 2016). Cet acide phosphatidique est produit *via* l'activité d'une PI-PLC et d'une DAG-kinase et utilisé au niveau de la pellicule pour activer la sécrétion des micronèmes, un processus induit pas le Ca^{2+} (Bullen *et al.*, 2016).

En résumé les *Apicomplexa* sont capables de récupérer de l'acide phosphatidique de l'environnement externe et de le synthétiser *de novo* via une activité AGPAT dans le réticulum endoplasmique qu'on qualifie « d'eucaryote » et par l'hydrolyse des phospholipides via l'activité d'une phospholipase PLD et d'une DAG-kinase.

Dans ce manuscrit, mon étude doctorale avait pour but d'apporter des éléments de réponse à trois questions majeures :

L'apicoplaste, a-t-il conservé la voie procaryote de synthèse de l'acide phosphatidique décrite chez les bactéries et dans le chloroplaste des plantes et algues ?

Les acides gras issus de *FASII* entrent dans la composition de quelles classes lipidiques et quelle est l'implication de l'apicoplaste dans ce processus ?

Existe-il d'autres voies de synthèse de l'acide phosphatidique dans le parasite ?

De ce fait, je vous présente d'abord, l'étude réalisée sur la première étape de la voie de synthèse de l'acide phosphatidique « type procaryote » dans l'apicoplaste de *T. gondii*. Cette synthèse implique l'activité d'une GPAT, nommée ATS1 par homologie à celle décrite dans le chloroplaste des plantes. Cette étude a été entamée avant le début de mon

doctorat et actuellement publiée dans le journal international *Plos Pathogens* (Chapitre I). Ensuite, le travail réalisé tout au long de mon doctorat sur l'étude des activités AGPAT dans l'apicoplaste et le réticulum endoplasmique de *T. gondii*. Les résultats de cette étude feront l'objet d'une publication très prochainement (Chapitre II). Finalement, je présente les travaux supplémentaires qui ont été réalisés en informations supplémentaires à chaque chapitre.

Résultats

Chapitre I :

Etude de la voie de synthèse de l'acide lysophosphatidique et son implication dans la synthèse des phospholipides membranaires chez *Toxoplasma gondii*

I- Préambule

Auteurs :

Souad Amiar¹, James I. MacRae, Damien L. Callahan, David Dubois¹ Giel G. van Dooren, Melanie J. Shears, Marie-France Cesbron-Delauw, Eric Maréchal, Malcolm J. McConville, Geoffrey I. McFadden, Yoshiki Yamaryo-Botté, Cyrille Y. Botté.(2016)

« Apicoplast-Localized Lysophosphatidic Acid Precursor Assembly Is Required for Bulk Phospholipid Synthesis in *Toxoplasma gondii* and Relies on an Algal/Plant-Like Glycerol 3-Phosphate Acyltransferase ». *PLoS Pathogens* 12(8): e1005765

Durant son développement intracellulaire, *T. gondii* est entouré de la membrane de la vacuole parasitophore qui le protège à l'intérieur de la cellule hôte. Cette membrane s'étend en même temps que la réplication du parasite. Cette expansion de la membrane de la vacuole parasitophore ainsi que la formation des nouvelles membranes (plasmique et celle des organites) requièrent une importante quantité de lipides pour la biogénèse membranaire. Les phospholipides (PLs) représentent la classe lipidique la plus abondante, plus de 70% des lipides totaux au niveau de la membrane plasmique de *T. gondii* (Foussard *et al.*, 1991 ; Welte *et al.*, 2007). De ce fait, les PLs sont importants pour le développement intracellulaire de *T. gondii* (Gupta *et al.*, 2005 ; Tawk *et al.*, 2011 ; Sampels *et al.*, 2012). L'assemblage des PLs chez *T. gondii*, se fait à partir des acides gras synthétisés *de novo* et ceux récupérés de la cellule hôte (Charron and Sibley, 2002 ; Bisanz *et al.*, 2006 ; Ramakrishnan *et al.*, 2012 ; Botté *et al.*, 2013 ; Ramakrishnan *et al.*, 2015). La phosphatidylcholine est le PL le plus abondant dans les différentes membranes du parasite (pellicule, apicoplaste et rhoptries) (Foussard *et al.*, 1991 ; Gupta *et al.*, 2005 ; Welte *et al.*, 2007, Besteiro *et al.*, 2008 ; Botté *et al.*, 2013). Bien que *T. gondii* est capable de récupérer la PC de la cellule hôte, la synthèse *de novo* reste cruciale pour le développement intracellulaire du tachyzoïte (Charron and Sibley, 2002 ; Gupta *et al.*, 2005).

Dans cette étude nous avons démontré que l'apicoplaste de *T. gondii* abrite la synthèse de l'acide lysophosphatidique *via* l'activité d'une enzyme glycérol 3-phosphate acyltransférase, TgATS1. Le LPA est le précurseur unique pour la synthèse de l'acide phosphatidique à partir des acides gras néo-synthétisés *de novo*. TgATS1 est un orthologue de l'enzyme ATS1 décrite dans le chloroplaste des plantes et est responsable



de la première étape de synthèse « procaryote » du PA. Dans cette étude nous décrivons l'importance de *TgATS1* pour le développement intracellulaire de *T. gondii*. Cette importance se traduit par le rôle de *TgATS1* dans l'incorporation des acides gras issus de *FASII* C14:0 et C16:0 principalement, dans la synthèse de la majorité des phospholipides membranaires (PC, PE et PI). Dans les chapitres précédents, nous avons pu constater que ces PLs, ainsi que leur composition en acides gras à chaînes longues issus de *FASII* (et leurs dérivés de l'élongation), sont des composants importants des différentes membranes du parasite. Ainsi, l'utilisation d'un mutant inductible *TgATS1-iKO* a permis de visualiser les défauts drastiques dans la structure membranaire de l'apicoplaste et du parasite entier, survenus suite à la répression de l'activité *ATS1*. Dans cette étude, nous avons alors démontré que les acides gras synthétisés *de novo* dans l'apicoplaste, sont assemblés dans l'organite pour former le LPA nécessaire à la synthèse des classes phospholipidiques les plus importantes pour la biogénèse membranaire de *T. gondii*.

Des résultats supplémentaires ne figurant pas dans l'article, sont ajoutés à la fin du chapitre.

II- Article (Page suivante)

RESEARCH ARTICLE

Apicoplast-Localized Lysophosphatidic Acid Precursor Assembly Is Required for Bulk Phospholipid Synthesis in *Toxoplasma gondii* and Relies on an Algal/Plant-Like Glycerol 3-Phosphate Acyltransferase

Souad Amiar¹ , James I. MacRae^{2,3} , Damien L. Callahan^{4,5}, David Dubois¹, Giel G. van Dooren⁶, Melanie J. Shears^{1,5}, Marie-France Cesbron-Delauw⁷, Eric Maréchal⁸, Malcolm J. McConville³, Geoffrey I. McFadden^{5†}, Yoshiki Yamaro-Botté^{1‡*}, Cyrille Y. Botté^{1‡*}

1 ApicoLipid group, Institute for Advanced Biosciences UMR5309, CNRS, Université Grenoble Alpes, INSERM, Grenoble, France, 2 The Francis Crick Institute, The Ridgeway, Mill Hill, London, United Kingdom, 3 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bio21 Molecular Science & Biotechnology Institute, University of Melbourne, Melbourne, Victoria, Australia, 4 Centre for Chemistry and Biotechnology, School of Life and Environmental Sciences, Deakin University, Burwood, Victoria, Australia, 5 School of BioSciences, University of Melbourne, Melbourne, Victoria, Australia, 6 Research School of Biology, Australian National University, Canberra, Australian Capital Territory, Australia, 7 BNI group, TIMC-IMAG UMR5525 CNRS, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France, 8 Unité de recherche (UMR) 5168, CNRS, CEA, INRA, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France

 These authors contributed equally to this work.

‡ GIM, YYB and CYB also contributed equally to this work.

* yoshiki.yamaro@gmail.com (YYB); cyrille.botte@ujf-grenoble.fr; cyrille.botte@gmail.com (CYB)



 OPEN ACCESS

Citation: Amiar S, MacRae JI, Callahan DL, Dubois D, van Dooren GG, Shears MJ, et al. (2016) Apicoplast-Localized Lysophosphatidic Acid Precursor Assembly Is Required for Bulk Phospholipid Synthesis in *Toxoplasma gondii* and Relies on an Algal/Plant-Like Glycerol 3-Phosphate Acyltransferase. *PLoS Pathog* 12(8): e1005765. doi:10.1371/journal.ppat.1005765

Editor: Kami Kim, Albert Einstein College of Medicine, UNITED STATES

Received: July 16, 2015

Accepted: June 22, 2016

Published: August 4, 2016

Copyright: © 2016 Amiar et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

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

Funding: CYB gratefully acknowledges grants from Agence Nationale pour la recherche (ANR RPDOc Apicolipid and ParafraP labex ANR-11-LABX-0024, France), ATIP-Avenir (CNRS-Inserm France), Fondation Innovation en Infectiologie (Finovi Apicolipid), Université Grenoble Alpes (AGIR Apicolipid) for their support to this work and to SA, MJS (ANR), YYB (ANR, Finovi), DD (Atip-Avenir).

Abstract

Most apicomplexan parasites possess a non-photosynthetic plastid (the apicoplast), which harbors enzymes for a number of metabolic pathways, including a prokaryotic type II fatty acid synthesis (FASII) pathway. In *Toxoplasma gondii*, the causative agent of toxoplasmosis, the FASII pathway is essential for parasite growth and infectivity. However, little is known about the fate of fatty acids synthesized by FASII. In this study, we have investigated the function of a plant-like glycerol 3-phosphate acyltransferase (TgATS1) that localizes to the *T. gondii* apicoplast. Knock-down of TgATS1 resulted in significantly reduced incorporation of FASII-synthesized fatty acids into phosphatidic acid and downstream phospholipids and a severe defect in intracellular parasite replication and survival. Lipidomic analysis demonstrated that lipid precursors are made in, and exported from, the apicoplast for de novo biosynthesis of bulk phospholipids. This study reveals that the apicoplast-located FASII and ATS1, which are primarily used to generate plastid galactolipids in plants and algae, instead generate bulk phospholipids for membrane biogenesis in *T. gondii*.

GIM acknowledges a Program Grant from the National Health and Medical Research Council (Australia) and a Discovery Grant from Australian Research Council. MJM is an NHMRC Principal Research Fellow. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author Summary

Apicomplexan parasites are the causative agents of several major human diseases including toxoplasmosis and malaria, caused by *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. respectively. Obligate intracellular stages of these parasites undergo periods of rapid asexual replication which require synthesis of large amounts of lipids for membrane biogenesis. These lipids can either be scavenged from the host cell and/or synthesized *de novo* by the parasite. Many of the enzymes involved in *de novo* fatty acid biosynthesis are localized in a non-photosynthetic relict plastid, named the apicoplast, suggesting that this organelle may generate fatty acids and phospholipids that are used for bulk membrane biogenesis. However, it is not known to what extent fatty acids generated by the apicoplast are exported to other cell membranes. Here we show that a key enzyme required for bulk phospholipid biosynthesis, glycerol 3-phosphate acyltransferase, is localized to the *T. gondii* apicoplast. Comprehensive lipidomic analysis of an acyltransferase null mutant suggested that apicoplast-synthesized phospholipid precursors are subsequently exported and used for bulk phospholipid synthesis. This process is essential for parasite growth and virulence in host cells.

Introduction

Apicomplexan parasites include the etiological agents of a number of devastating human diseases, including malaria (*Plasmodium* spp.), toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) and cryptosporidiosis (*Cryptosporidium* spp.). Most Apicomplexa harbor a plastid of prokaryotic origin, termed the apicoplast [1–3]. While the apicoplast lacks the enzymes involved in photosynthesis, this organelle contains many of the other metabolic pathways found in plant and algal plastids, including a prokaryotic type II fatty acid synthesis pathway (FASII) [4]. Since the apicoplast is essential for parasite survival, some of these pathways are considered attractive drug targets [5–8]. The discovery of the FASII pathway suggested that these parasites synthesise fatty acids (FA) *de novo*, rather than relying solely on supply from their host as was initially thought [4, 9, 10]. Subsequent genetic studies showed that components of the *T. gondii* FASII pathway (e.g. acyl carrier protein) are essential for the intracellular growth of the rapidly dividing tachyzoite stages [11, 12]. FASII is also essential to parasite development in mosquito stages of *P. falciparum* [13] and liver stages of *P. berghei* and *P. yoelii*, the rodent malaria models [14, 15].

Upon invasion of host cells, most apicomplexan parasites become surrounded by a membrane, termed the parasitophorous vacuolar membrane (PVM), which expands as the parasite develops and replicates. Both PVM expansion and parasite plasma/organelle membrane production during replication are reliant on recruitment of phospholipids (PLs) for membrane biogenesis. Indeed, PLs are the major lipid class found in *T. gondii* parasite membranes, accounting for up to 80–90% of the total lipid content [16, 17]. PL synthesis is essential for parasite replication and enzymes involved in their assembly are promising drug targets [18–20]. In *T. gondii*, PL assembly is supported by both scavenged and *de novo*-synthesised FA, while mature PLs such as phosphatidylcholine (PC) may also be scavenged [21]. PC is the most abundant PL species in *T. gondii* and *P. falciparum* membranes [16, 17]. PC synthesis is critical for *T. gondii* tachyzoite replication and *Plasmodium* blood and liver stages [22–25], while specific inhibitors of PC biosynthesis are currently in clinical trials as anti-malarial drugs [26, 27]. Other important PLs include phosphatidylethanolamine (PE), accounting for up to 20% PL in these parasites [16, 17], and phosphatidylinositol (PI), which is essential for apicoplast biogenesis, glycolipids, glycosylphosphatidylinositol anchors (GPI), membrane dynamics and integrity, and parasite survival [17, 28–31].

PL synthesis is initiated by successive acyltransferase-dependent additions of fatty acyl chains to the hydroxyl groups of glycerol 3-phosphate (G3P) to generate phosphatidic acid (PA). PA is the central precursor for the *de novo* synthesis of diacylglycerol by phosphatidic acid phosphatase (PAP) and for the synthesis of CDP-dicacylglycerol (CDP-DAG) by CDP-DAG synthase (CDS) [32, 33]. In Apicomplexa, as in algae/plants, most modification of FA (i.e. elongation, dehydration) and major steps for *de novo* synthesis of PL using PA as central precursor occur in the endoplasmic reticulum (ER). However, the exact details of PL synthesis are not yet fully understood and apparently involve other organelles such as mitochondria [33–35]. Moreover, the source of acyl chains required for PA assembly in apicomplexan parasites remains unclear. Plants have two pathways for *de novo* PA assembly, namely an ER-localised ‘eukaryotic-origin’ pathway and a plastid-localised ‘prokaryotic-origin’ pathway, which produce distinct PL products [33]. The ER-localised pathway generates PC and galactolipids (which are ultimately trafficked to the chloroplast), while the plastid pathway generates galactolipids, sulfolipids, and phosphatidylglycerol (PG) [33]. Both sources of galactolipids are essential for chloroplast structural integrity and photosynthetic function in plants and, in phosphate-deprived conditions, can replace PL in extraplastidial membranes (for reviews, see [36–38]). Plastid PA is synthesized *de novo* by the initial esterification of an acyl chain onto the sn-1 position of G3P by a G3P acyl-transferase (G3PAT, or ATS1), followed by esterification of a second acyl chain onto the sn-2 position by an acyl-G3P acyltransferase (LPAAT, or ATS2) [32].

While Apicomplexa lack galactolipids [17, 39, 40], genome mining of *T. gondii* and *Plasmodium* spp. reveals putative homologs of ATS1 and ATS2 [10, 41–43]. Interestingly, a recent study on *P. yoelii* showed that a homolog of ATS1 (PyapiG3PAT) was essential for the development of late liver stages, phenocopying *P. yoelii* and *P. berghei* FASII mutants [44]. However, the precise role of the apicoplast in parasite membrane biogenesis and the intracellular fate of plastid-synthesised FA are unknown in both *T. gondii* and *Plasmodium*. Whilst there is evidence for the ‘eukaryotic-origin’ pathway in *P. falciparum* since it possesses an ER membrane-bound G3PAT, the function of this enzyme is still unknown [45]. Moreover, an ER membrane-bound G3PAT is yet to be characterized in *T. gondii*.

There is considerable complexity in the acyl chains incorporated into PA and PL. Apico-plast-localised FASII generates FA up to a chain length of 14–18 carbons, which can be exported to the ER for further elongation [12, 17, 46]. How and where these FA are incorporated into PA is not known. A better understanding of PA assembly, and how its downstream products are then distributed throughout the parasite membrane network, will be crucial in fully understanding membrane biogenesis in these parasites.

To determine the apicoplast contribution to PL biosynthesis in *T. gondii*, we generated a conditional TgATS1 mutant. We found that TgATS1 is targeted to the apicoplast and is critical for organelle formation, parasite growth and normal intracellular development. ¹³C-glucose metabolic labelling and mass spectrometry-based lipidomic analyses revealed major defects in incorporation of apicoplast-synthesised C14:0 and PL assembly in TgATS1-deficient parasites. Our results show that the apicoplast TgATS1 is responsible for the synthesis of a C14:0-containing lysophosphatidic acid (LPA, the obligate intermediate in PA production), which is subsequently used to assemble major PL classes (PC, PE and PI).

Results

TgATS1 is a plastid-localised algal/plant-like glycerol 3-phosphate acyltransferase

In plant and algal plastids, PA biosynthesis is initiated by a soluble G3PAT called ATS1. Searches of the *T. gondii* genome with plant ATS1 genes revealed a homolog that we named T.

gondii acyl transferase 1 (TgATS1) (Fig 1A). Structure modelling of TgATS1 using the *Cucurbita moschata* (squash or pumpkin) ATS1 (CmATS1) structure [47, 48] as a threading template suggests that TgATS1 contains two domains: one comprising a four α -helix bundle, and a second larger domain formed of 11 α -helices and 10 mixed parallel/anti-parallel β -sheets (Fig 1A–1D). The larger domain apparently contains the substrate-binding and catalytic sites involved in (i) G3P binding, (ii) FA binding, (iii) catalysis (NHX₄D motif), and (iv) FA selectivity, similar to the plant ATS1 (Fig 1A and 1B). The NHX₄D motif typical of all G3PATs [49] is localised to the same putative groove in CmATS1 (Fig 1C, detailed in S1A–S1C Fig) and TgATS1 (Fig 1D, detailed in S1D–S1F Fig). Furthermore, the cluster of positively charged residues that surround the catalytic pocket and bind G3P in CmATS1 (Fig 1C; H167, K221, H222, R263, R265) are conserved in TgATS1 (Fig 1D). Plastid ATS1s are soluble whereas non-plastid G3PATs are membrane-bound [45]. TgATS1 has no obvious transmembrane domains, suggesting it is also soluble. Phylogenetic analysis confirms that TgATS1 clusters with algal, plant, and photosynthetic ATS1s and diverges from eukaryotic GPATs (S1G Fig).

TgATS1 is predicted to localize to the apicoplast due to the presence of a bipartite N-terminal targeting sequence [41, 50]. To localize TgATS1, we generated a construct that expressed TgATS1 with a C-terminal triple haemagglutinin (3xHA) epitope-tag under control of an anhydrotetracycline (ATc)-regulated promoter [51] and expressed this construct in parasites expressing the apicoplast marker ferredoxin NADP⁺ oxidoreductase-red fluorescent protein (FNR-RFP) (S2A Fig). Immunofluorescence assays (IFA) co-localized TgATS1-HA protein with FNR-RFP (Fig 1E) and another apicoplast stromal marker, chaperonin 60 (CPN60) (Fig 1F). Taken together, these data indicate that TgATS1 is a plant-like, apicoplast-localised homo-log of ATS1.

Disruption of TgATS1 causes defects in organellar and daughter cell development

To investigate the role of TgATS1 in parasite growth, we disrupted the endogenous copy of TgATS1 (eTgATS1) by insertion of a selectable marker (chloramphenicol acetyl transferase, CAT) into the TgATS1 ORF using a double recombination approach with a recombinering cosmid (S2B Fig, [52]). Four independent TgATS1-HA-iKO strains were generated: two bearing a TATI-inducible TgATS1-HA copy (TgATS1-HA-iKO), and two equivalent mutants in the FNR-RFP background (TgATS1-iKO/FNR-RFP). Disruption of the endogenous gene locus was confirmed by PCR (S2C Fig) and Southern blotting (S2D Fig). All subsequent analyses were independently performed using each mutant TgATS1 line.

TgATS1-HA was detected by Western blot as two distinct bands with apparent molecular masses of 72 kDa and 55 kDa (Fig 2A). These likely correspond to the pre-processed (pATS1, including the complete or partial N-terminal bipartite sequence) and mature (mATS1, apico-plast-resident) forms of the protein, respectively. Addition of ATc to the culture medium down-regulated TgATS1-HA-iKO expression, with pATS1 and mATS1 no longer detectable by Western blot after 3 and 4 days, respectively (Fig 2A). Plaque assays were performed to determine the effect of TgATS1 down-regulation on parasite growth. ATc treatment of parental lines produced no detectable growth defect (Fig 2B, top panels). ATc treatment of TgATS1-HA-iKO parasites resulted in almost complete ablation of host cell lysis and plaque formation (Fig 2B, bottom right panel), although growth assays after 8 days of TgATS1 repression in a TgATS1-HA-iKO strain expressing cytosolic tdTomato indicated that some parasites may continue to grow, albeit slowly (S3 Fig).

To discern the cause of this growth arrest, we examined mutant parasites by IFA. Strikingly, we observed partial loss of apicoplast-localized FNR-RFP after 4 days of ATc treatment, with

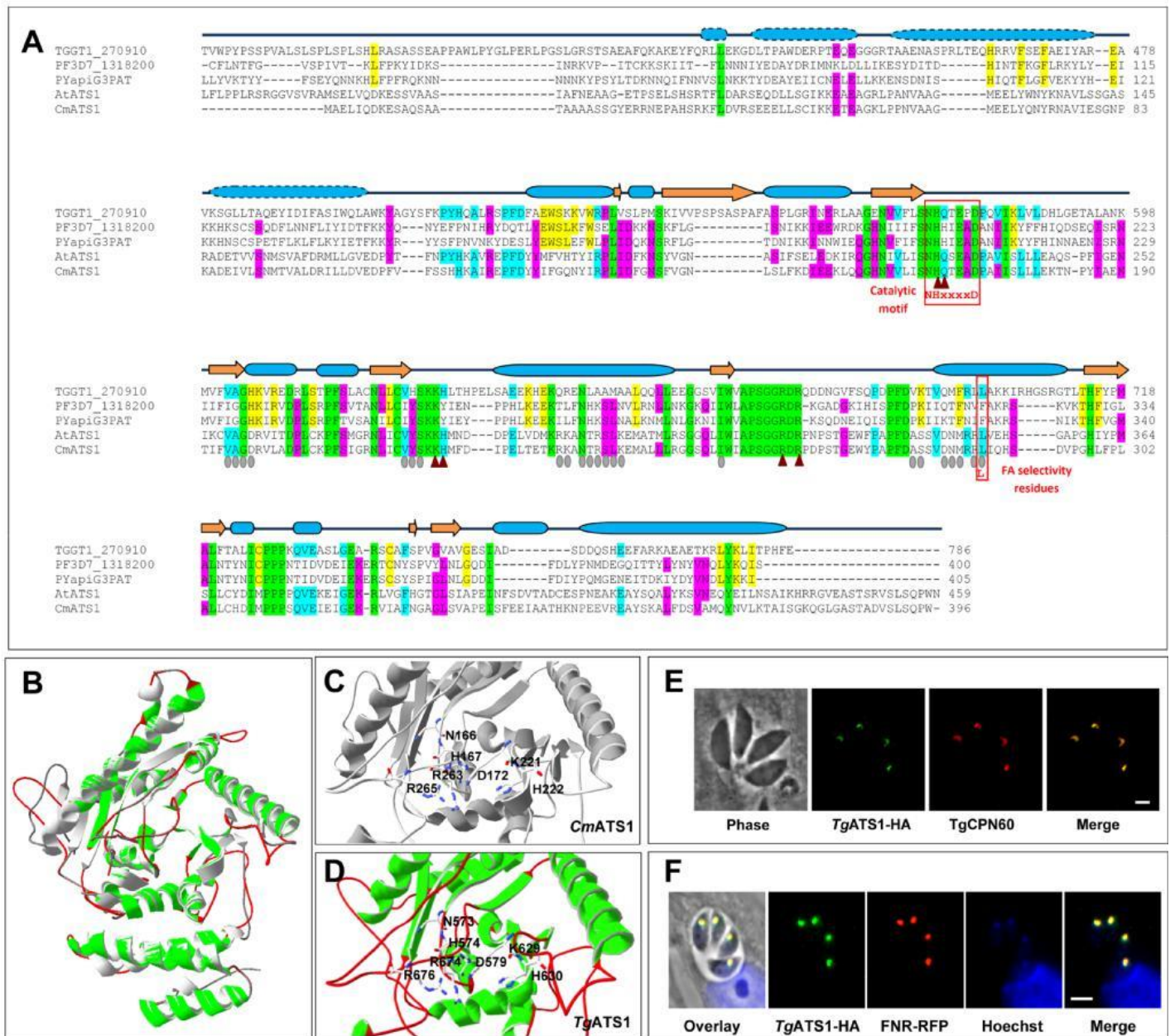


Fig 1. TgATS1 is a plant-like G3PAT residing in the stroma of the *T. gondii* apicoplast. (A) Structure-based protein sequence alignment of G3PATs from *T. gondii*, TgATS1 (TGGT1_270910), *P. falciparum* (PF3D7_1318200), *P. yoelii* (PYapiG3PAT), *A. thaliana* (AtATS1, [68]) and *C. moschata* (CmATS1, [47]). Residues strictly conserved between all species are highlighted in green, residues conserved in at least three species in cyan, residues conserved in apicomplexan sequences in yellow, and residues conserved between TgATS1 and plant ATS1 (AtATS1 and CmATS1) in blue. Brown triangles and grey ovals represent residues putatively involved in G3P or FA binding, respectively. Secondary structures [47, 67] are represented above the sequence alignment by blue cylinders for α -helices and orange arrows for β -strands. Domain 1 of the protein (4-helix bundle) is symbolized with dashed lines and Domain 2 (α - β Domain) in solid lines. Residues putatively involved in binding the G3P substrate in CmATS1 (brown triangles) are strictly conserved in TgATS1, while those putatively involved in binding the acyl-ACP substrate are highly conserved (grey ovals). (B) Overlay of the CmATS1 crystal structure ([47]) and the predicted TgATS1 3D structure. The overall structure and surface accessibility of CmATS1 (grey) and TgATS1 (green and magenta) is conserved and highly similar as observed in the ribbon representation. (C) Residues putatively involved in binding substrate (G3P) and those involved in the catalytic motif NH_x4D of CmATS1 form a catalytic pocket with His-167 and Asp-172. (D) Both the motif and topology of the pocket are strictly conserved in TgATS1 (His-574 and Asp-579). (E, F) IFA shows that TgATS1 is a stromal-resident protein of the apicoplast, as confirmed by co-localization with fluorescence of (E) the chimeric apicoplast-stroma FNR-RFP reporter protein co-expressed in the TgATS1-iKO parasite line and (F) anti-CPN60, a known marker of the apicoplast stroma [51]. Scale bars represent 2 μ m.

doi:10.1371/journal.ppat.1005765.g001

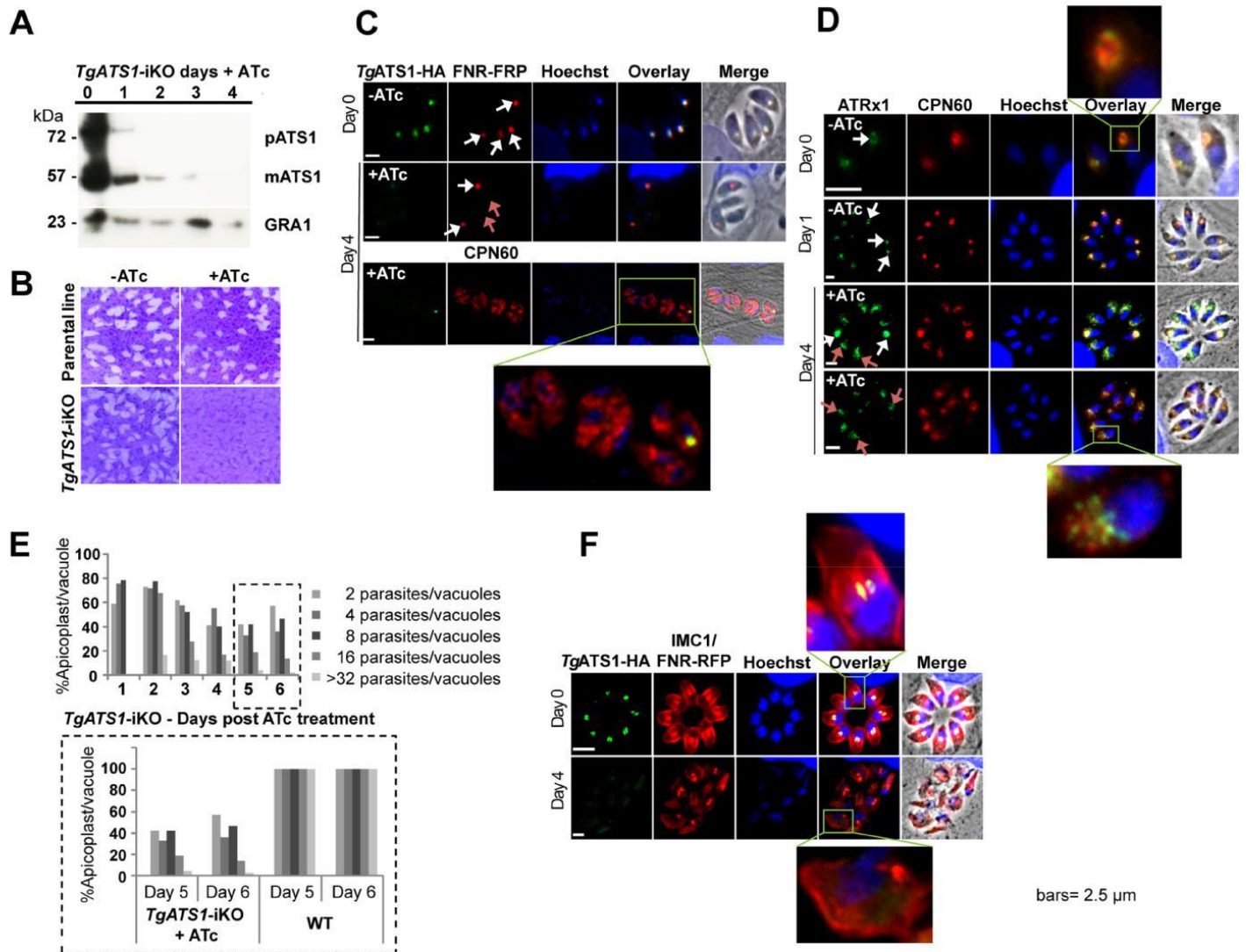


Fig 2. TgATS1 is critical for normal intracellular development and division. (A) Inducible knockdown of TgATS1 in the TgATS1-HA-iKO line. TgATS1 was detected by Western blot analysis using anti-HA antibody as two bands: the pre-mature form (pATS1, ~75KDa) and the mature form (mATS1, ~55KDa). Protein expression was down-regulated to undetectable levels by 3 or 4 days of ATc treatment (1 mg/mL ATc, numbers indicate days of culture). GRA1 (lower panel) served as a loading control. (B) Plaque assays performed in the absence (-) or presence (+) of ATc and fixed after 10 days show an impaired lytic cycle of TgATS1-HA-iKO parasites in the presence of ATc. (C) IFA of TgATS1-HA-iKO parasites using anti-HA antibody and apicoplast stromal markers FNR-RFP (two upper panels) and CPN60 antibody (lower panel) indicates loss of HA and apicoplast signals in the presence of ATc for 4 days (white arrows indicate normal apicoplast while red arrows indicate loss of apicoplast signal), as well as the cytosolic mis-localisation of apicoplast CPN60 (lower panel, zoomed area). (D) IFA of TgATS1-HA-iKO parasites using antibodies against the apicoplast stromal marker CPN60 and the apicoplast outer membrane marker ATRx1 confirms mis-localisation of CPN60 and ATRx1, indicating loss of apicoplast structure (lower panels, zoomed areas). White arrows indicate normal apicoplast and red arrows indicate a normal apicoplast. (E) Quantification of the number of intact apicoplasts relative to parasites and vacuoles in TgATS1-HA-iKO parasites following ATc treatment. A significant loss of apicoplasts was observed in the presence of ATc (upper graph) of up to 60% at days 5 and 6, compared to the wild type (parental) strain that contained 100% apicoplasts in all vacuoles regardless of the number of parasites per vacuole (lower panel). (n = 100 vacuoles). (F) IFA of TgATS1-HA-iKO parasites using anti-IMC1 antibody grown in the presence and absence of ATc indicates IMC structure defect (zoomed areas). Scale bars: 2.5 μ m.

doi:10.1371/journal.ppat.1005765.g002

some parasites displaying no signal at all (Fig 2C). IFA against the apicoplast stromal protein, CPN60, revealed that loss of TgATS1 resulted in redistribution of CPN60 from a typically punctate apicoplast staining to a diffuse cytoplasmic staining (Fig 2C). This was also observed using antibodies against the apicoplast outer membrane marker ATRx1 (Fig 2D), suggesting a

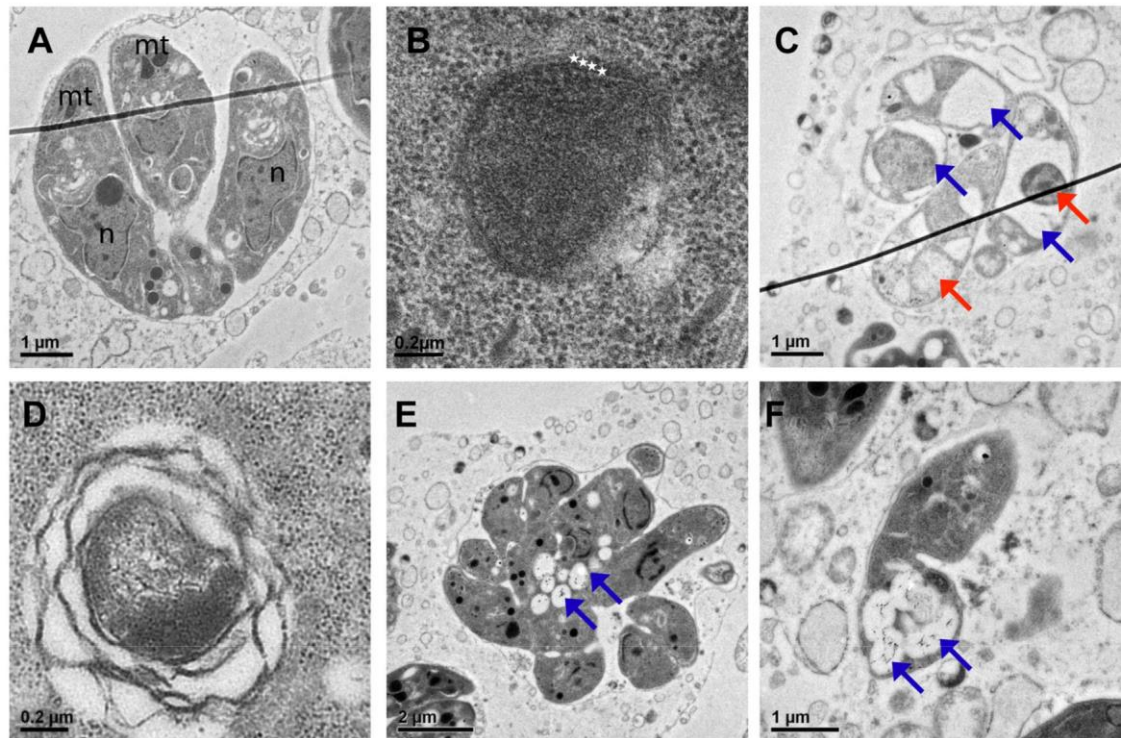


Fig 3. TgATS1 disruption affects tachyzoite division and the morphology of intracellular organelles. Transmission electron micrographs showing a typical vacuole containing 4 TgATS1-iKO intracellular tachyzoites in the absence of ATc, each bearing normal intracellular organelles such as the mitochondrion (mt) and nucleus (n) (A), with an apicoplast surrounded by 4 membranes as indicated by white stars (B). In the presence of ATc, intracellular development of TgATS-iKO parasites was drastically affected, resulting in parasites bearing aberrant organelles shown by red arrows and large electron lucent regions shown by blue arrows (C). Apicoplast biogenesis was also affected in the presence of ATc, with only a few parasites bearing an apicoplast and, of those present, morphological aberrations were observed, including disorganized membranes and atypical stroma (D). Intracellular division also seemed affected upon TgATS1 disruption (E). Parasites often displayed large electron-lucent vesicles containing an unusual ribbon-like material shown by blue arrows (E, F). Scale bars are indicated in each figure.

doi:10.1371/journal.ppat.1005765.g003

loss of apicoplast structure. To investigate this further we quantified the number of parasites containing an intact apicoplast over the course of 6 days of ATc treatment (Fig 2E). Although some parasites lost their apicoplast within the first day, the greatest loss appeared after 5–6 days of ATc treatment. Inner membrane complex (IMC) formation (as observed with anti-IMC antibodies) was also greatly affected and, together with apicoplast abrogation, was associated with changes in parasite morphology (Fig 2F). These observations suggested that TgATS1 is required for organelle formation and parasite division.

Transmission electron microscopy of TgATS1-iKO parasites revealed further defects in intracellular parasite morphology (Fig 3). Untreated parasites morphology was unperturbed (Fig 3A), containing apicoplasts with the canonical four membranes (Fig 3B). However, after 3 days of ATc treatment, a number of ultrastructural changes were observed including (i) the accumulation of large electron-lucent vesicles and abnormal intracellular compartments (Fig 3C); (ii) the appearance of apicoplasts with grossly malformed membranes that had detached from each other (Fig 3D); (iii) the complete loss of apicoplasts (Fig 3E); (iv) and the accumulation of multiple vacuoles harbouring filamentous material (Fig 3F). Taken together, these studies show that loss of TgATS1 expression leads to marked changes in apicoplast morphology and defects in the biogenesis of this organelle and parasite development.

TgATS1 disruption reduces FASII C14:0 generation and FA elongation

To determine the role of TgATS1 in lipid biosynthesis, ATc-treated and untreated TgATS1-iKO parasites were labelled with U-¹³C-glucose (i.e. glucose where all carbons are ¹³C) and the *de novo* synthesis of fatty acids assessed by mass isotopomer distribution (MID) analysis of total parasite fatty acids by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. MID involves quantification of the molecular ions of individual unlabelled fatty acid methyl esters and corresponding isotopomers generated by incorporation of ¹³C-skeletons derived from glucose, after subtraction of natural abundance isotopomers. For example, the MID of the palmitoyl methyl ester (*m/z* 270) containing a backbone of 16 carbons involves quantification of all ions from *m/z* 270 (indicated as M0) to *m/z* 286 (indicated as M16). We have previously used this approach to distinguish the rate of FA synthesis via the plastid FASII and ER-based elongation pathways through sequential condensation of two-carbon units from ¹³C-malonyl-CoA onto the growing FA chain (Fig 4, [8, 12]).

Intracellular tachyzoites were labelled with U-¹³C-glucose for 1–4 days in the presence or absence of ATc, and total parasite FA was analysed by GC-MS. As expected, a wide range of FA were labelled in the absence of ATc (Fig 5A and 5B, S4A Fig) [12, 17, 53, 54]. Interestingly, incorporation was highest after 2 days and decreased by day 4, suggesting that parasites may switch from *de novo* synthesis to increased salvage of host fatty acids at later time points (Fig 5B). Inspection of MIDs revealed uniform labelling of some of the saturated FA, C14:0, C16:0, and unsaturated FA C16:1, confirming that labelling was due to (apicoplast located) *de novo* synthesis rather than (ER-located) elongation reactions (Fig 5C and 5D, S4B Fig and S5 Fig).

Labelling of parental cell lines with U-¹³C-glucose (or U-¹³C-acetate, see below) was unaffected by addition of ATc, while host cell lipids were not labelled in either condition [12]. Addition of ATc to the TgATS1-iKO did not significantly affect ¹³C-incorporation into C14:0, C16:0, C16:1, and C18:1 after 1 day (Day 1, S4A Fig), but resulted in a significant decrease of ¹³C-incorporation into C14:0 by day 2 (Day 2, Fig 5A), and C14:0, C16:0, C16:1, and C18:1 by day 4 (Fig 5B). Importantly, the fraction of C14:0 and C16:0 molecules that were labelled after 4 days of TgATS1 repression incorporated ¹³C up to the full complement of 14 or 16 atoms, indicating that FASII was still active (Fig 5D, S5 Fig). Interestingly, while cellular abundance of all fatty acids was slightly (yet significantly for five of the 11 fatty acids) reduced after 2 days of TgATS1 repression (Fig 5E), a different pattern was observed after 4 days (Fig 5F). Here, cellular abundance of C14:0 was greatly and significantly reduced, with smaller reductions observed for C16:0, C16:1, C18:1, and C20:1 (significantly for the latter two). Conversely, longer chain saturated fatty acids increased in abundance (significantly for C20:0) (Fig 5F). Taken together, this indicates that TgATS1 disruption results in reduced flux through the FASII pathway, which might be partly compensated by increased fatty acid recycling/remodelling after 4 days of TgATS1 repression.

To investigate the effect of TgATS1 disruption on FA elongation, intracellular *T. gondii* tachyzoites were labelled with U-¹³C-acetate and harvested and analysed as above (see Fig 4 for labelling strategy schematic). U-¹³C-acetate, through conversion to ¹³C-acetyl-CoA and then ¹³C-malonyl-CoA, is efficiently used by the ER-localized elongase machinery, but not apicoplast FASII, providing a specific measure of elongation [12, 53, 54]. In the absence of ATc, high levels of ¹³C incorporation were observed in the longer chain (>C16) FA, with incorporation increasing with chain length (Fig 5G), as observed previously [53]. MID analysis suggested that ¹³C-acetate was incorporated onto unlabelled C14:0 or C16:0 to produce longer chain fatty acids (as observed by isotopologues sequentially increasing by 2 mass units for all FA 16 carbons and longer; Fig 5H and 5I, S6 Fig). After 4 days of TgATS1 repression by ATc, ¹³C incorporation was significantly reduced for some FA (C16:1, C18:0, C18:1, C20:0, C20:1, and

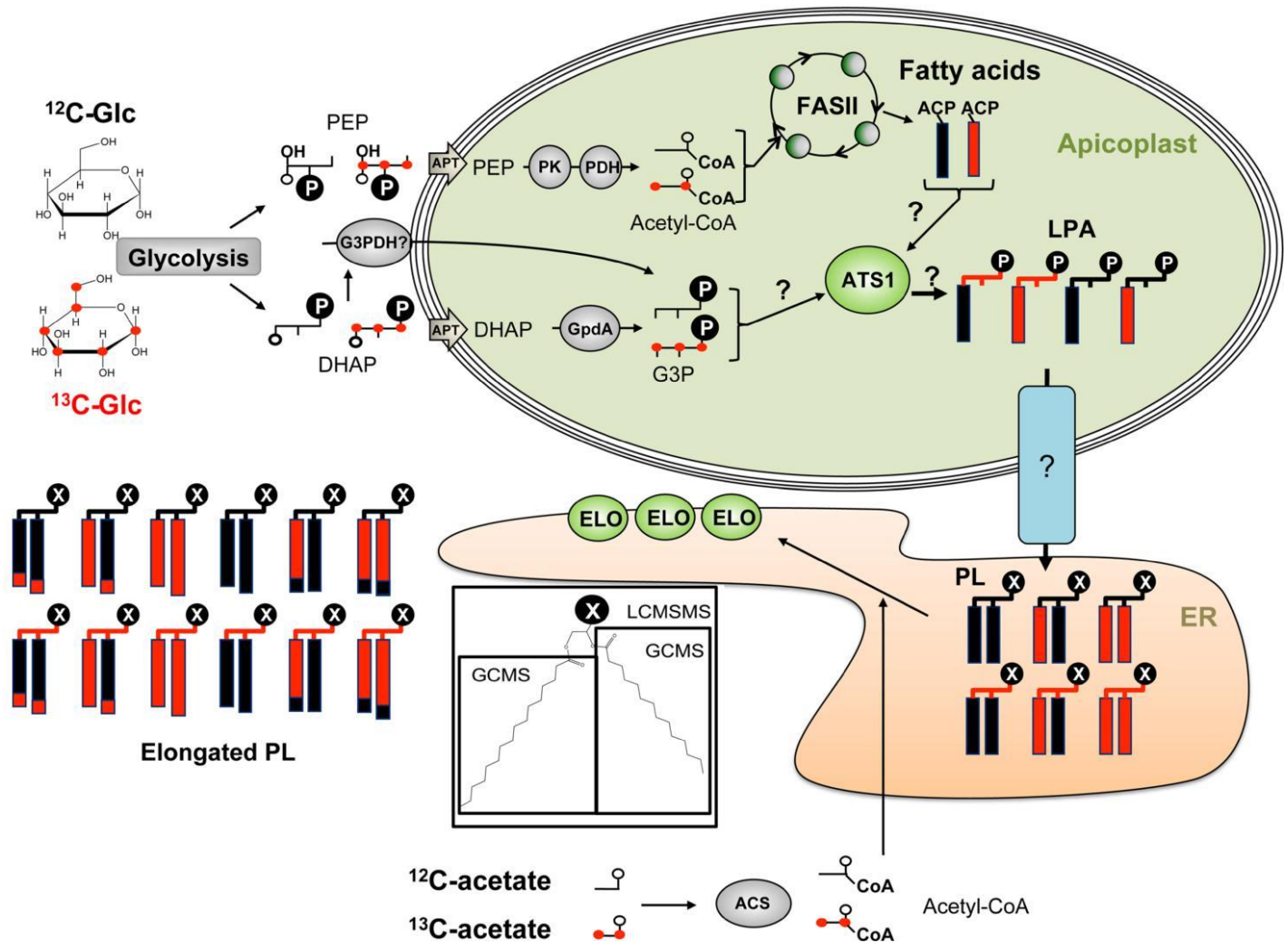


Fig 4. ^{13}C -carbon source labelling strategies to assess the role of FASII and TgATS1 in *T. gondii* membrane biogenesis. TgATS1-iKO parasites were grown in the presence of ^{12}C -glucose or ^{13}C -glucose in the presence or absence of ATc. Glucose is metabolized via the parasite glycolytic pathway into dihydroxyacetone-phosphate (DHAP) and phosphoenolpyruvate (PEP). These precursors are imported into the apicoplast via the apicoplast phosphate transporter (APT). PEP can then be transformed into acetyl-CoA via the action of the apicoplast pyruvate kinase (PK) and the pyruvate dehydrogenase complex (PDH). Acetyl-CoA serves as a substrate for the FASII pathway to generate growing acyl chains on an acyl carrier protein (ACP) scaffold. Glycerol 3-phosphate (G3P) can be generated from imported DHAP by the apicoplast glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GpdA), or potentially by an as yet unidentified cytosolic G3P dehydrogenase (G3PDH). Both labelled and/or unlabelled G3P and FA can be used as a substrate by the apicoplast TgATS1 (glycerol 3-phosphate acyltransferase) to form lysophosphatidic acid (LPA). These LPA species can potentially be exported from the apicoplast towards the ER to be assembled into phospholipids (PL) and/or have its FA elongated via the three ER elongases (ELO). In order to assess ER elongation, TgATS1-iKO parasites were grown in the presence or absence of ATc together with ^{12}C -acetate or ^{13}C -acetate, which is metabolized to cytosolic acetyl-CoA by acetyl-CoA synthetase (ACS). Collectively, this strategy enabled the determination of (i) apicoplast FASII-generated FA products, (ii) products assembled via TgATS1, and (iii) PL species generated via the apicoplast. Total lipid extracts from TgATS1-iKO parasites grown in the described conditions were analyzed by two mass spectrometry techniques. GC-MS was used for the measurement of total FA profiles and LC-MS/MS was used to determine the relative amounts of ^{13}C incorporation into individual PL molecular species. In the cartoon, unlabelled and labelled moieties are shown in black and red, respectively.

doi:10.1371/journal.ppat.1005765.g004

C22:0), although not all (Fig 5G). Interestingly, despite reduced abundance (Fig 5F), ^{13}C incorporation significantly increased in C14:0 and C16:0. Taken together, these analyses suggest that loss of TgATS1 results in a selective defect in the synthesis of saturated long chain fatty acids in the apicoplast, but that this can be partially compensated for by increased elongation of fatty acids scavenged from the host cell.

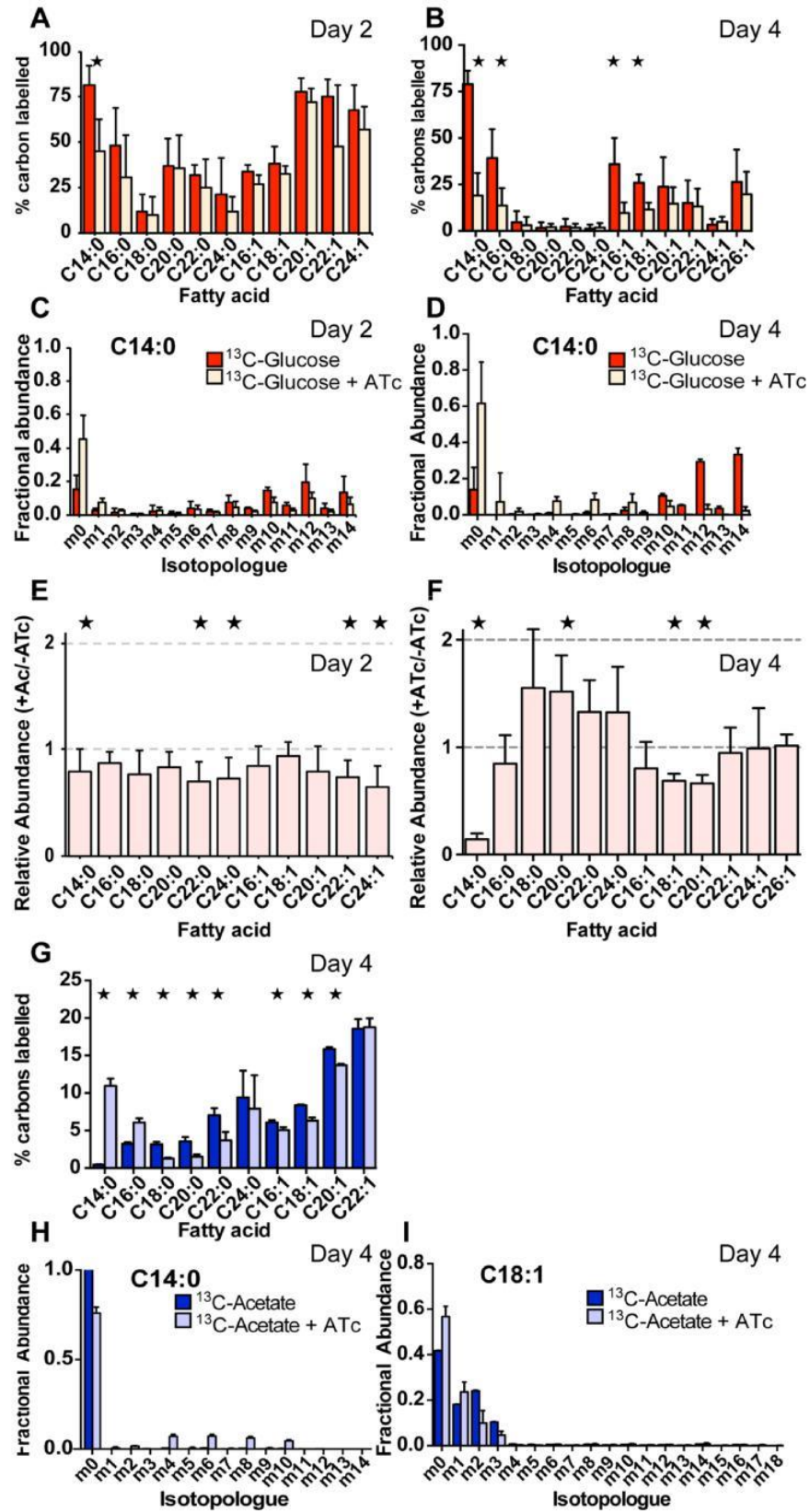


Fig 5. Analysis of FASII fatty acid biosynthesis and elongation in TgATS1-iKO parasites by metabolic labelling using stable isotope precursors. Tachyzoites of TgATS1-iKO parasites were labelled with U-¹³C-glucose for 2 or 4 days or U-¹³C-acetate for 4 days in the presence or absence of ATc. Lipids were extracted, derivatized to form fatty acid methyl esters (FAMES), and analysed by GC-MS to determine ¹³C incorporation. (A, B) ¹³C incorporation into fatty acids from U-¹³C-glucose in the absence (dark colour) or presence (light colour) of ATc for 2 (A) and 4 days (B). (C, D) Mass isotopologue distributions (MID) of FA (C14:0) from U-¹³C-glucose in the absence or presence of ATc for 2 (C) and 4 days (D) (colour scheme as above). The x-axis indicates the number of ¹³C atoms in each FAME, where 'm0' indicates the monoisotopic mass containing no ¹³C atoms, while 'mX' represents that mass with 'X' ¹³C atoms incorporated). MID for the all detected FAMES using U-¹³C-glucose are shown in S5 Fig. (E, F) Changes in the overall abundance of FAMES for TgATS1-iKO parasites grown in the absence or presence of ATc for 2 (E) and 4 days (F). (G) ¹³C label incorporation rate into fatty acids from U-¹³C-acetate in the absence (dark colour) and presence (light colour) of ATc for 4 days. (H, I) MID for C14:0 (H) and C18:1 (I) labelled with U-¹³C-acetate in the absence (dark colour) and presence (pale colour) of ATc for 4 days. MID for the all detected FAMES using U-¹³C-acetate are shown in S6 Fig. Error bars indicate standard deviation (n = 4 biological replicates). Stars represent significant (p < 0.05) differences as determined by t-test, corrected by the Holm-Sidak method.

doi:10.1371/journal.ppat.1005765.g005

The apicoplast is responsible for biosynthesis of bulk phospholipid classes, most of which are generated via TgATS1

We hypothesised that TgATS1 may be required for incorporation of plastid-synthesised FA into LPA, an obligate intermediate of PA *de novo* synthesis (Fig 4). PA is the essential precursor for all *de novo*-synthesised PLs, which are bulk components of all cellular membranes, including those of the apicoplast. To assess the role of TgATS1 on PL biosynthesis, lipids from TgATS1-iKO parasites grown in the presence or absence of ATc were extracted and analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) for the three major PL classes: PC, PI and PE. Precursor ion scanning was used for PC and PI (precursors of m/z 184 in positive mode and m/z 241 in negative mode, respectively) and neutral loss scanning was used for PE (neutral loss of 141 u in positive mode).

In the absence of ATc, LC-MS/MS revealed a PL repertoire in untreated (and parental) parasites (Fig 6A, 6B and 6C) similar to previous reports [16]. Our analyses detected 27 PC molecular species (Fig 6A), eight PI molecular species (Fig 6B), and 16 PE molecular species (Fig 6C), each class containing FA moieties of various lengths and degrees of saturation.

U-¹³C-glucose labelling can be used to assess *de novo* synthesis of LPA and PA by observation of label incorporation into FA (as explained above) and the glycerol 3-phosphate (G3P) backbone to which the FA moieties are attached (Fig 4 shows possible combinations of label incorporation into LPA and PA). U-¹³C-glucose incorporation into the glycerol and acyl moieties of each PL class was measured using PL-specific scanning, as above. Since choline and ethanolamine are not synthesised from glucose, and *T. gondii* lacks the Ino1 enzyme required for *de novo* myo-inositol synthesis, no PLs were observed with labelled head groups [31]. Substantial incorporation of ¹³C-atoms into G3P and FA was observed in PC, PI and PE (Fig 6D, 6E and 6F, respectively). The mass spectra of individual PL species contained +3, +15, or 17 isotopomers (Fig 6D, 6E and 6F), corresponding to labelling of (i) only the G3P backbone (i.e. where +3 corresponds to incorporation of 3 × ¹³C atoms into the glycerol of PL) or (ii) the G3P backbone and an acyl chain (i.e. where +15 corresponds to incorporation of 3 × ¹³C atoms into glycerol and 12 × ¹³C atoms into an acyl chain, while +17 corresponds to incorporation of 3 × ¹³C atoms into glycerol and 14 × ¹³C atoms into an acyl chain). MS/MS analyses confirmed that these PL molecules contained one labelled and one unlabelled acyl moiety (examples of MS/MS spectra for PI(36:4) are shown in S7 Fig). Therefore these PL molecules were assembled on LPA(C14:0) containing either 12 or 14 labelled carbons, correlating with the ¹³C incorporation observed in C14:0 (S5 Fig).

Due to the complexity of the spectra obtained in these analyses, it was difficult to confirm the full identities of all ¹³C-labelled lipids. We used a novel high-resolution chromatographic

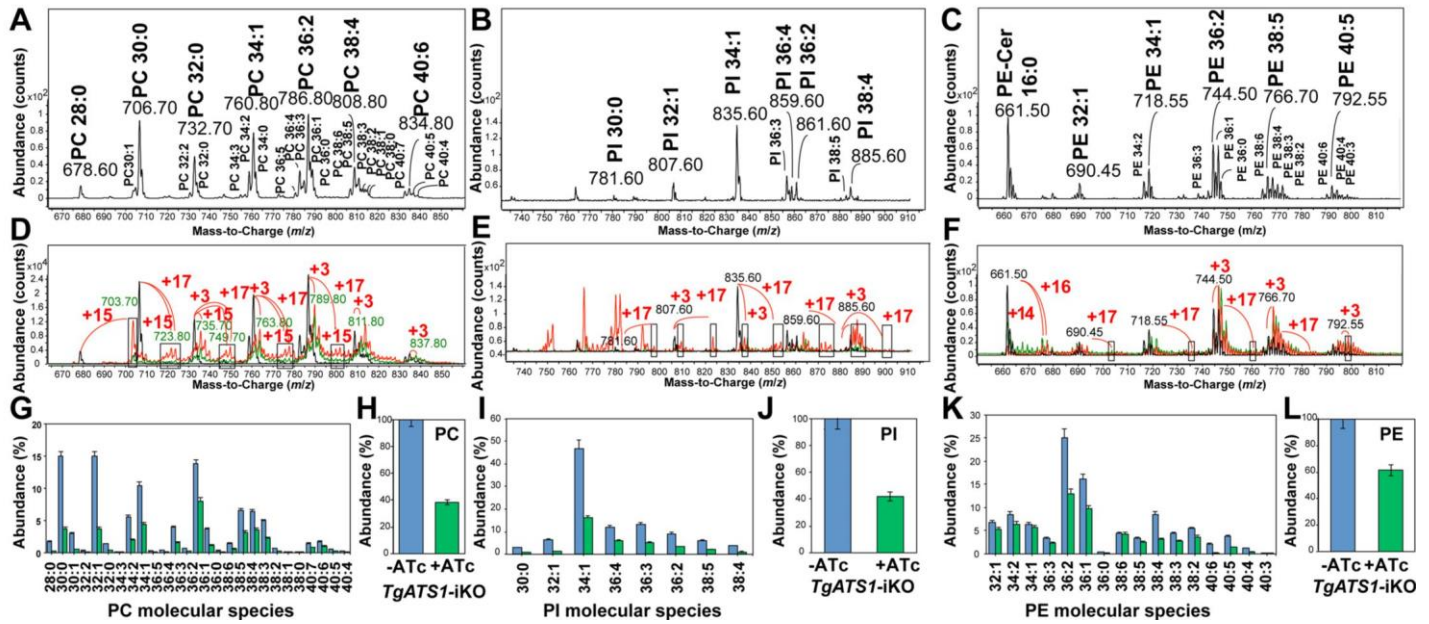


Fig 6. Metabolic labelling and LC-MS/MS analysis reveal that *TgATS1* is responsible for the bulk assembly of PC, PI and PE. (A, B, C) Representative mass spectra of unlabelled PC (A), PI (B), and PE (C) species from *TgATS1*-iKO parasites grown in the absence of ATc. PC molecular species were obtained by m/z 184 precursor ion scan in positive mode. PI molecular species were obtained by m/z 241 precursor ion scan in negative mode. PE molecular species were obtained by 141 u neutral loss scan in positive mode. (D, E, F) Representative mass spectra of U-¹³C-glucose-labelled PC (D), PI (E), and PE (F) molecular species from *TgATS1*-iKO parasites grown in the absence (red line) or presence of ATc (green line) for 4 days. Labelled molecular species displayed typical mass shifts of +3, +15 and/or +17 corresponding to fully-labelled G3P, LPA(12:0) and LPA(14:0), respectively. Under ATc treatment, labelling was greatly reduced in the parasite, especially for +15 and +17 mass shifts. The black line represents a parental unlabelled control. (G-L) LC-MS/MS analysis of individual molecular species and relative abundance of PC (G, H), PI (I, J) and PE (K, L). Parental parasite strain, shown in blue bars, and *TgATS1*-iKO parasites in the presence of ATc, shown in green bars (n = 3 with error bars representing standard deviation).

doi:10.1371/journal.ppat.1005765.g006

method to separate PL species of differing chain length, which allowed MS analysis of each molecular species (S8 Fig). This improved chromatography ensured that mass envelopes for each isotopologue series did not overlap, confirming that major PL species contained one or two labelled fatty acid moieties (an example of an MS/MS analysis for PC(30:0) is shown in S9 Fig). In all cases, the LPA moiety of the PL was labelled, providing direct evidence that apico-plast-synthesized FA can be assembled into LPA, thereby contributing to bulk PL composition. Upon ATc repression of

TgATS1 expression for four days, the abundance of individual (Fig 6G) and total (Fig 6H) PC and individual (Fig 6I) and total (Fig 6J) PI was reduced by up to 60%. Inspection of mass spectra revealed that *TgATS1* repression led to a reduction in ¹³C label incorporation in both PC (Fig 6D) and PI (Fig 6E), as observed by the reduced levels of +15, +17 ¹³C-atoms in most PL isotopologues (compare red (-ATc) and green (+ATc) spectra), indicative of reduced LPA assembly and subsequent PL synthesis. These analyses suggest that *TgATS1* assembles apico-plast-generated FA into the LPA precursor for PC and PI synthesis. Interestingly, while the abundance of individual (Fig 6K) and total (Fig 6L) PE was also reduced

(by up to 40%) upon *TgATS1* repression, the effect on ¹³C incorporation was minimal (Fig 6F).

Neutral loss scanning for PE revealed the presence of an ion of m/z 661.53, which did not correspond to any predicted PE mass (Fig 6C), but was identified as PE-ceramide (d18:1/16:0) by MS/MS analysis (S10A Fig). The C16:0 moiety of this PE-ceramide contained up to 14 or even 16 ¹³C-atoms (S10B Fig), suggesting that ceramide is also synthesized using de novo-synthesized fatty acids from the apico-plast. The abundance of this lipid was not affected after 4 days of *TgATS1* repression (S10C Fig) and, although label incorporation was affected under

these conditions, fully labelled FA was still present (S10B Fig), suggesting both that FASII was still active when TgATS1 is disrupted and that TgATS1 was not significantly responsible for PE-ceramide precursor production.

To further investigate this apparent specificity in TgATS1 contribution to PL assembly, we quantified the relative amount of labelled (i.e. apicoplast-synthesised) and unlabelled (scav-enged/remodelled) FA in PC, PI, and PE. Since the G3P backbone of all PLs may be generated by either a plastid or cytosolic G3P dehydrogenase (TGGT1_210260 or TGGT1_307570, respectively), we assumed that all species containing only 3 ¹³C-atoms were derived from a U-¹³C-G3P esterified to unlabelled (i.e. not apicoplast origin) FA, while all species that contained more than three ¹³C-atoms indicated a U-¹³C-G3P esterified to at least one labelled (i.e. apicoplast origin) FA. In untreated (and parental) parasites, the total amount of apicoplast-generated (i.e. labelled) FA was ~70%, 74% and 42% for PC, PI and PE, respectively (Fig 7A, 7B and 7C, respectively), where PLs with shorter FA moieties contained proportionally more apicoplast-generated FA than PLs with longer FA (Fig 7D (PC), 7E (PI) and 7F (PE)), correlating with our quantitative labelling analysis (Fig 6G, 6I and 6K, respectively). Specifically, PC species 38 and PI species 36 carbons were assembled from >50% apicoplast-derived FA (Fig 7D and 7E, respectively), while this was true for PE species of only 34 carbons in length (Fig 7F).

Precursor ion scans of *m/z* 241 for PI species also led to the identification of molecular species that were eventually identified as potential minor PE species. Fragmentation of these PE precursor ions indeed led to generation of *m/z* 241 in negative mode (S11 Fig). The analysis was also extended to the other PL species, namely phosphatidylglycine (PG), phosphatidylserine (PS), and the newly discovered phosphatidylthreonine (PT) [55]. PG and PS were beneath the limit of quantification. The identification of two ions of *m/z* corresponding to published PT species (*m/z* 850.56, PT(40:5); *m/z* 878.59 PT(42:5)) was attempted. However, MS/MS fragmentation could not confirm the identity of these ions as being PT species

TgATS1 is responsible for the synthesis of LPA (C14:0)

Since the putative product of TgATS1 is predicted to be LPA, the direct precursor to PA, label incorporation into LPA and PA was investigated. Despite our improved chromatographic resolution, we did not detect free LPA and PA by LC-MS. Instead, we purified PL species by two dimensional high performance thin layer chromatography (2D-HPTLC) and analysed individual species by GC-MS. While LPA remained undetectable, PA was observed (albeit in low amounts) and contained C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, and C18:1 FA moieties (Fig 8A). After 2 days of TgATS1 repression, ¹³C incorporation into PA(C14:0) was reduced significantly (Fig 8A), while incorporation into longer FAs (C16:0, C18:0) was reduced by day 4, albeit insignificantly (Fig 8B). Analysis of the PC spot (Fig 8C, day 2; 8D, day 4), confirmed the LC-MS results that ¹³C incorporation was significantly affected in PC species containing C14:0 FA. Importantly, the MID of PA(C14:0) in TgATS1-repressed parasites was very similar in pattern to, but of lower level than, the unrepressed control (Fig 8E, day 2; 8F, day 4), suggesting that (L)PA assembly is perturbed in these cells rather than FASII. The equivalent C14:0 MID in PC (Fig 8G, day 2; 8H, day 4), along with the relatively minor effects in label incorporation into PE and PE-ceramide (Fig 6F, S10B Fig), confirmed these results.

Although PA is downstream of the TgATS1 product LPA, we did not observe a significant reduction of total PA after 4 days of TgATS1 repression (Fig 8I). However, quantification of the fatty acid repertoire of PA revealed a significant reduction of LPA(C14:0) in the presence of ATc (Fig 8J and 8K), suggesting that this lipid may be a major product of TgATS1. To investigate whether LPA(C14:0) is important for parasite survival, we investigated whether exogenous

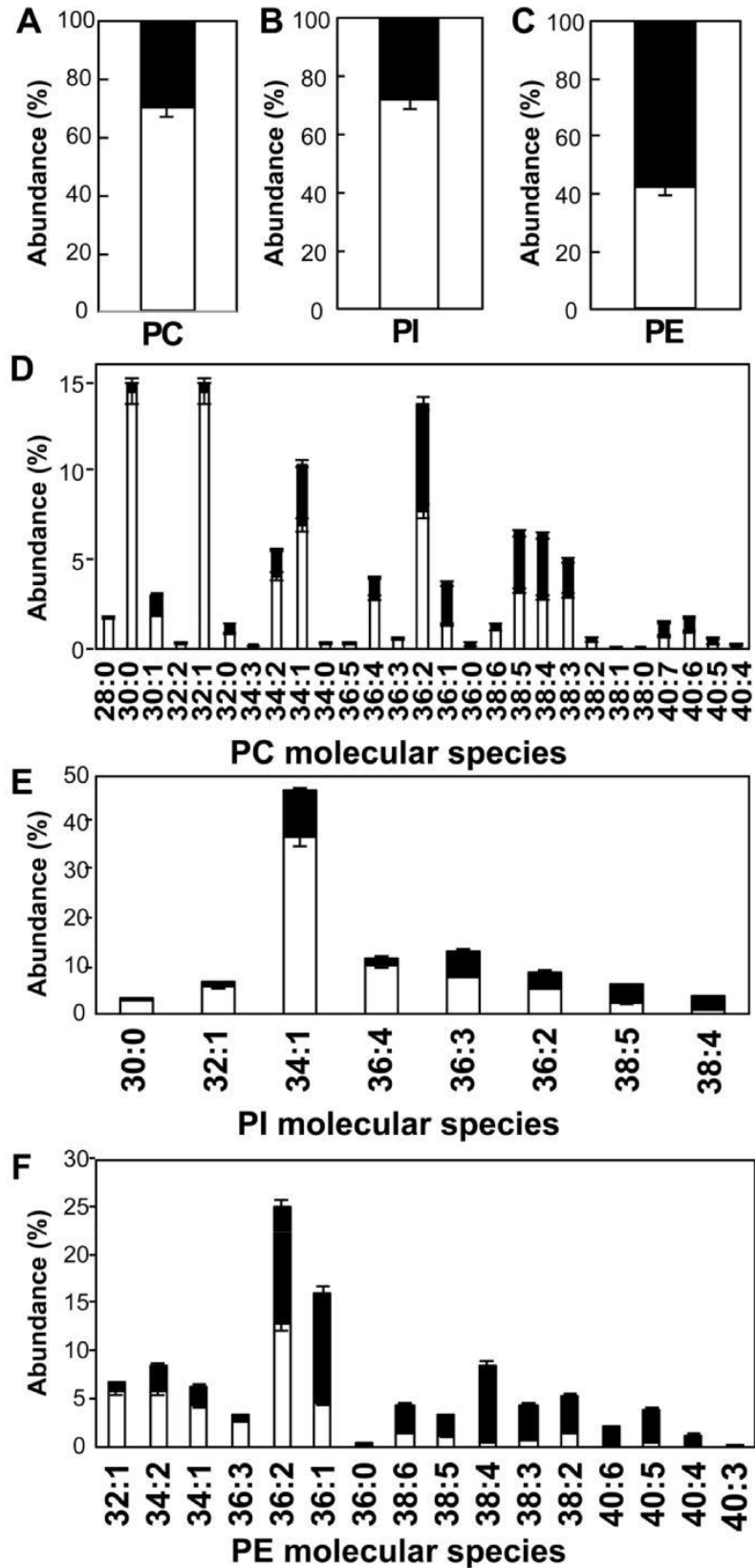


Fig 7. U-¹³C-glucose incorporation to fatty acids determines the apicoplast generates the FA moieties for production of most PC and PI molecular species. U-¹³C-glucose was incorporated into ATc-untreated parasites grown in glucose-free medium. LC-MS/MS analysis of labelled molecular species that have incorporated 4 or more ¹³C-atoms allowed quantification of apicoplast-generated species as shown in white, while all other species (mass shift +3) allowed quantification of non-apicoplast-generated species as shown in black. (A, B, C) Relative abundance for total PC (A), PI (B) and PE (C). (D, E, F) Relative abundance of individual molecular species for PC (D), PI (E), and PE (F). The data shows that the apicoplast generates the FA moieties for production of ~70% PC, ~72% PI, and ~42% PE molecular species. Error bars indicate standard deviation, (n = 3 biological replicates).

doi:10.1371/journal.ppat.1005765.g007

LPA could rescue cell growth in plaque assays. Infected fibroblasts were treated with/without ATc, in the presence or absence of LPA(C14:0) or LPA(C16:0) in the culture medium (Fig 8L). Strikingly, addition of LPA partially restored parasite growth, an effect that was only observed when using LPA(C14:0) (Fig 8L, lower left panel), and not LPA(C16:0) (Fig 8L, lower right panel). These data confirm that TgATS1 has a specific role in generating LPA(C14:0) using api-coplast-derived fatty acids and that this species is critical for other PL biosynthetic pathways.

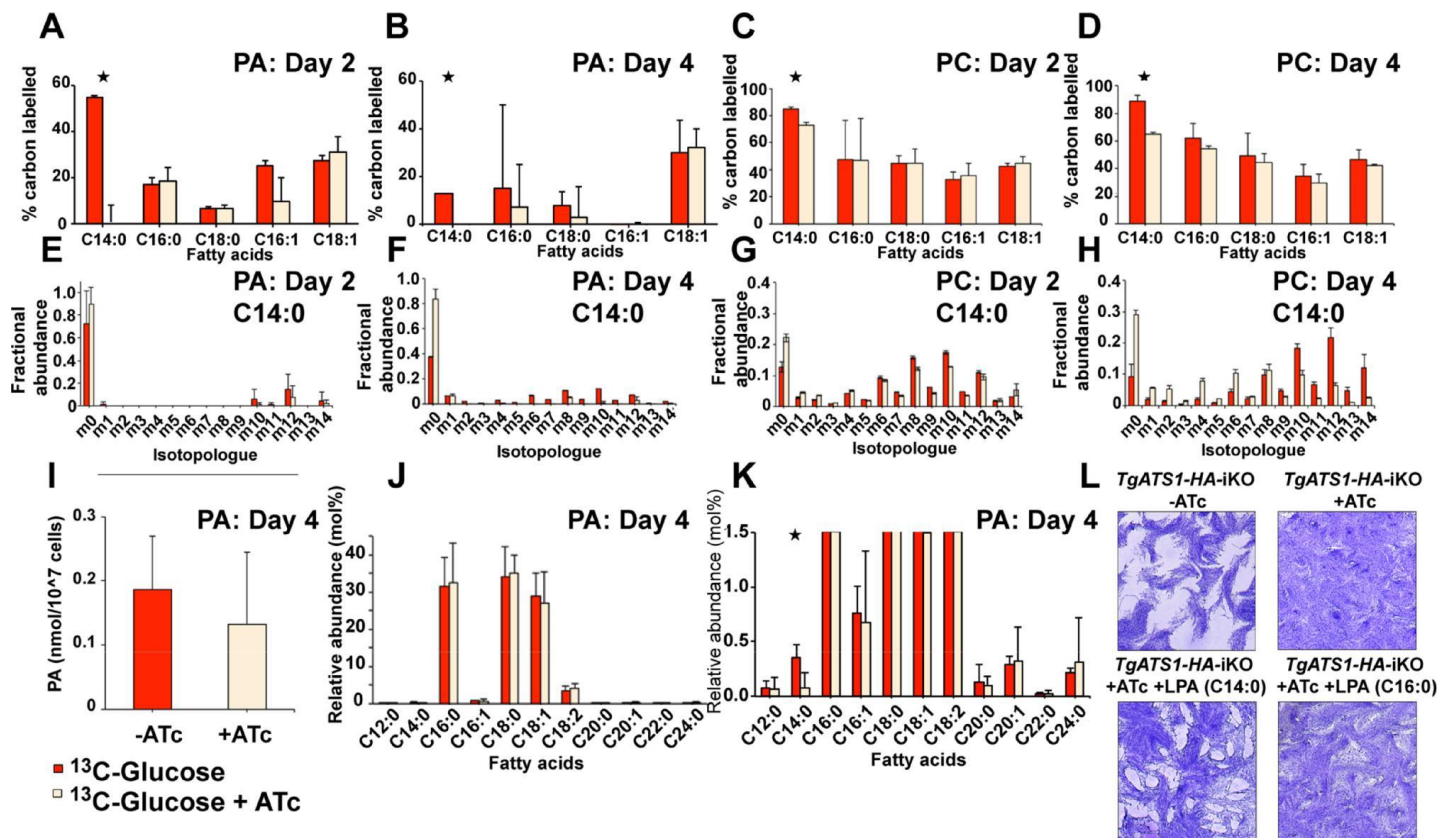


Fig 8. Analysis of PA and PC biosynthesis in *TgATS1*-iKO parasites using U-¹³C-glucose labelling. Tachyzoites of *TgATS1*-iKO parasites were labelled with U-¹³C-glucose in the presence (dark red) or absence (light red) of ATc for up to four days. Lipids were extracted, derivatized, and the resulting FAMES were analysed by GC-MS to determine isotope incorporation. (A, B) Mean label incorporation from U-¹³C-glucose into PA in the absence or presence of ATc for 2 (A) and 4 days (B). (C, D) Mean label incorporation from U-¹³C-glucose into PC in the absence or presence of ATc for 2 (C) and 4 days (D). (E-H) Corresponding MIDs of C14:0 from panels A-D. 'm0' indicates the monoisotopic mass containing no ¹³C atoms, while 'mX' represents that mass with 'X' ¹³C atoms incorporated). (I) Quantification of PA after 4 days growth in the presence (dark red) or absence (light red) of ATc. (J) Abundance of each fatty acid species in PA, presented as a fraction (mol. %) of the total PA fatty acid pool (enlarged to show detail of low abundance FAMES in (K)), colour scheme as above. For all analyses, error bars indicate standard deviation (n = 3 biological replicates). Stars indicate significant differences (p < 0.05) as determined by t-test, corrected by the Holm-Sidak method. (L) *TgATS1*-HA-iKO parasite plaque assay in the presence of LPA(C14:0) or LPA(C16:0). LPA(C14:0), but not LPA(C16:0), restored growth in the *TgATS1*-repressed (+ATc) parasites.

doi:10.1371/journal.ppat.1005765.g008

Discussion

Recent studies have shown that FA synthesized in the *T. gondii* apicoplast by the FASII enzyme complex can be trafficked to the parasite ER where they are further elongated and desaturated [12, 53, 54]. However, it remained unclear to what extent apicoplast-generated FA are incorporated into membrane phospholipids and why *de novo* FA biosynthesis cannot be bypassed by FA scavenging pathways.

Here we demonstrate that the apicoplast of *T. gondii* harbours a glycerol 3-phosphate acyl-transferase, TgATS1, that is orthologous to the plant chloroplast ATS1 responsible for the initiation of the prokaryotic PA synthesis pathway. We show that TgATS1 is responsible for the recruitment of FASII-generated FA (most notably C14:0) into bulk synthesis of major phospholipid classes (PC, PE and PI) found throughout the parasite membranes and that this is critical for normal parasite growth and development, as also observed in *P. yoelii* liver stages [44]. A similar phenotype was observed in plants, although the loss of ATS1 function may be partially compensated by a second, ER-localised PA synthesis pathway of eukaryotic origin maintaining minimal plant development [56, 57]. Despite having this second pathway, a similar compensation is not observed in *T. gondii*. This may be because plant (and algal) ATS1 assembles FASII-generated FA only into plastid-specific lipids, including PG and galactolipids [56, 57]. In contrast, our data indicates that apicoplast lipid precursor synthesis has a much broader role in total lipid production in *T. gondii*, possibly as a result of having evolved to provide FA/lipids to the ER.

In algae and plants, FA and G3P can be assembled in the plastid via ATS1 to form LPA, which is the precursor for all other phospholipids. We show that TgATS1 is a typical, soluble algal/plant-like ATS based on sequence similarity and structural modelling. TgATS1 has a putative domain II containing all of the residues required for catalysis, including the catalytic pocket motif (NHX4D) arranged in a similar spatial arrangement to that of plant ATS1. Our results suggest that TgATS1 displays specificity regarding FA length (i.e. showing a preference for C14:0 over C16:0). Since FA specificity could have strong implications for membrane biogenesis during intracellular parasite development, FA selectivity should be addressed more closely in these parasites.

De novo synthesis of fatty acids in the apicoplast

Using U-¹³C-glucose incorporation as a marker for FASII synthesis, we show here and in previous studies [54] that the apicoplast FASII machinery generates FA ranging from C12:0 to C16:0, and only a minor amount of C18:0. When TgATS1 is repressed (by addition of ATc) for 4 days, we observed reduced ¹³C incorporation into most FA species (Fig 5B). Over the course of ATc treatment, we also observed severe disruption in apicoplast morphology and biogenesis, as well as changes in the IMC and most intracellular compartments (Figs 2C–2F and 3). We cannot distinguish between the possibilities that reduced ¹³C incorporation into FA is directly linked to the loss of TgATS1, or rather the loss of the apicoplast (and hence concomitant loss of FASII). The possibility that FA biosynthesis *per se* is not disrupted following repression of TgATS1 is suggested by the finding that ¹³C-incorporation into PE-ceramide was largely unaffected by TgATS1 repression, even after 4 days (S10B and S10C Fig). As ceramide synthesis is not dependent on TgATS1 (S10B and S10C Fig) [58], this finding suggests that FASII is maintained in TgATS1-repressed cells, at least until the apicoplast is irrevocably damaged. Maintenance of FASII activity was also confirmed by (i) the late loss of the apicoplast after 5–6 days of TgATS1 repression (Fig 2E) and (ii) the detection of fully labelled FA moieties in PL after 4 days of TgATS1 repression (Figs 5B, 6G–6L and 8B and 8D).

Using U-¹³C-acetate, we also observed ER-localized elongation of FA. This is a key difference from the plant chloroplast, where C16:0 and C18:0 typically constitute the major FASII

end products (for a review, see [38]). Interestingly, when TgATS1 is repressed, ^{13}C incorporation from ^{13}C -acetate is significantly increased in C14:0 (Fig 5G), most likely as an attempted compensatory mechanism responding to loss of C12:0 C14:0, C16:0 FA moieties. This suggests that the elongases could be used for *de novo* FA synthesis, or that ^{13}C -acetate/ ^{13}C -acetyl-CoA can enter the apicoplast and supply FASII when apicoplast integrity is compromised, although this is insufficient to support parasite growth. MID analysis of C14:0 (S6 Fig) suggests that an 8-carbon precursor (e.g. octanoate, C8:0) could be elongated under these conditions, perhaps reflecting increased scavenging of host lipids (such as lipoic acid) in an attempt to overcome reduced *de novo* PL assembly [46]. This increased scavenging may explain the low level of continued parasite growth observed after 8 days under TgATS1 repression (S3 Fig).

Most observed lipids/phospholipids are affected by the loss of ATS1 in *T. gondii*, most significantly in the decrease of C14:0 (Figs 5B and 8K) and those PLs derived from LPA containing C12:0 and C14:0 (Fig 6). Moreover, when labelling with U- ^{13}C -glucose, mature PL species with shorter FA (i.e. where the two acyl chains combined total 28 to 36 carbons) contained relatively more ^{13}C -labelled FA than PLs with longer FA moieties (>36 carbons). These PL species were much more affected by TgATS1 loss (Fig 6). These results suggest that the parasite preferentially uses shorter, apicoplast-synthesised FA (C12-C18) for PL production. Longer chain (>C18) FA can also be used for PL synthesis, but are likely of non-plastid origin (e.g. via scavenging from the host, and/or remodelling of existing membrane lipids). Since only LPA (C14:0) could successfully rescue the loss of TgATS1 (Fig 8L), it is possible that LPA(C14:0) may act not only as the substrate for subsequent PL assembly but also in a signalling role to control overall lipid biosynthesis, although this remains to be confirmed.

Function of the apicoplast in membrane biogenesis

Apicoplast FASII and ATS1 contribute to the synthesis of PL synthesis in the parasite, including the three PL classes, PC, PE and PI. This is a major departure from chloroplasts, the photosynthetic plastids of algae/plants, where the plastid-generated FA incorporated into LPA and PA via the PA synthesis pathway are solely used for the assembly of chloroplast lipids (i.e. galactolipids, sulfolipids and PG) [33]. Only under stressed conditions such as phosphate deprivation are chloroplast-derived glycerolipids transported to extra-plastidial membranes to compensate for loss of PL biosynthesis [42, 59]. Instead of generating galactolipids, apicomplexan parasites may have evolved to export LPA (and/or PA) from the apicoplast to the ER to generate PL for global membrane biogenesis. The machinery for export of LPA/PA is yet to be identified and may involve the contact sites observed between apicoplast and ER membranes in *T. gondii* [60]. Interestingly, plant chloroplasts possess a multimeric ATP-binding cassette (ABC) transporter that allows PL and possibly PA import into chloroplasts [61]. It is plausible that similar machinery may have evolved in Apicomplexa to export LPA/PA from the plastid, in a manner reminiscent of the change in function of the apicomplexan ER-associated protein degradation (ERAD) machinery allowing import, rather than export, of protein into the apicoplast [62].

The mechanism by which TgATS1-generated LPA is converted to PA and then PL remains unclear. The genome of *T. gondii* (and *Plasmodium* spp.) contains a hypothetical complete plant-like PA synthesis pathway that is predicted to be in the apicoplast, including ATS1 and a lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT, or ATS2). Interestingly, immunofluorescence studies in *P. yoelii*, suggest that ATS2 (PyLPAAT) partially localises to the ER, despite the presence of a predicted N-terminal bipartite apicoplast-targeting sequence [44]. It will be of interest to determine whether TgATS2 resides in the ER, and hence whether it could convert LPA exported from the apicoplast to PA in the ER. Alternatively, ATS2 could be dually targeted to, or transported between, both organelles.

Continued synthesis of PLs may be required for transport of membrane vesicles to and from the apicoplast and the maintenance of apicoplast integrity. Consistent with this notion, we show that repression of TgATS1 is associated with both the complete loss of the apicoplast organelles and/or the appearance of unusual vacuolar structures (Fig 3). In addition, internal compartment structure was highly affected upon the loss of TgATS1 (Figs 2F and 3), suggesting that TgATS1-generated PLs could be distributed throughout the cell to participate in global membrane biogenesis. Previous reports have hypothesised that apicoplast-derived FA may participate in apicoplast biogenesis in *T. gondii* [11] (and during liver stages of the rodent malaria parasites *P. berghei* and *P. yoelii* [14, 15, 44]). Our observations of defective apicoplast biogenesis in the TgATS1 mutants support this idea, although we could not conclude whether this phenotype was due to a lack of PL for maintenance of apicoplast integrity or a general 'loss of apicoplast/FASII' phenotype. It would be interesting to assess the origin of *T. gondii* apicoplast membrane lipids, as has been done for *P. falciparum* [17].

We observed that while 70–74% of PC and PI fatty acids were of apicoplast-origin (Fig 7A and 7B, respectively), TgATS1 repression resulted in the reduction of ~60% of PC and PI abundance (Fig 6H and 6J, respectively), suggesting that a considerable fraction (~10–15%) of PC and PI pools were also synthesised through this alternative, non-ATS1 route. The source of PA is not only from the ATS1-dependent apicoplast *de novo* pathway but also from PL recycling pathways, for example via DAG-kinase [63]. This likely explains why the loss of ATS1 did not significantly affect the total amount of PA (Fig 8J). Since PA is the central precursor for PL synthesis, the source(s) of PA should be proportionally reflected in all downstream PL. However, the loss of TgATS1 did not fully reflect this, since the incorporation of ¹³C label from U-¹³C-glucose into PC and PI was greatly affected by TgATS1 repression, while that of PE was less perturbed. This could be due to the difference in the substrate specificity of each synthetic pathway. For instance, elements/enzymes of the PC and PI biosynthetic pathways might have a preference for substrates with shorter acyl chains of apicoplast origin. Conversely, PE biosynthetic elements/enzymes might have a preference for longer acyl chains, likely derived from recycling pathways. Indeed, LC-MS/MS analyses revealed that PC and PI were present of shorter chain length (from PC(28:0) and PI(30:0)) than PE (from PE(32:1)) (Fig 7D–7F).

An alternative hypothesis could be due to the pathways downstream of ATS1 and ATS2. *De novo*-synthesized PA is usually converted to diacylglycerol (DAG) or cytidyldiphosphate-DAG (CDP-DAG) for subsequent PL synthesis. The *T. gondii* genome encodes two putative CDP-DAG synthetases (CDSs): TGGT1_281980 (TgCDS1, a homolog to eukaryotic CDS), and TGGT1_263785 (TgCDS2). TgCDS1 (ER) and TgCDS2 (apicoplast) have recently been localized and their disruption affects the synthesis of PI and PG, respectively [64]. This also supports the hypothesis that each CDS may have its own substrate specificity and, moreover, that this specificity may be related to the localization of these enzymes. The two putative *T. gondii* phosphatidic acid phosphatases (PAPs), generating DAG [63], have been localized in the cytosol or in the vicinity of the IMC of *T. gondii*, suggesting that the conversion of PA to DAG may occur outside the apicoplast, but any site-dependent substrate specificity is not yet known. It is not yet clear whether the specificity to the substrate determines enzyme localization or vice-versa. In addition, PE synthesis has been shown to rely on (i) ER-localized ethanolamine phosphotransferases (EPTs), (ii) conversion of PS to PE by a mitochondrial PS decarboxylase (TgPDSmt), and (iii) a putative direct scavenging from the host cell [35]. These multiple sources and localizations of the PE biosynthetic pathways, especially those outwith apicoplast-ER interactions, may explain why PE is less affected by the loss of TgATS1 than PC and PI.

Conclusion

This study shows that apicoplast-generated FAs constitute an important source of precursors for bulk phospholipid biosynthesis during intracellular tachyzoite development. We show that apicoplast-synthesized FA are added to glycerol 3-phosphate by the enzyme TgATS1 to form LPA in the apicoplast. We propose that LPA is then converted to PA, and that LPA and/or PA are then trafficked to the ER, where they are ultimately converted to PC, PI, PE, and/or their precursors (DAG, CDP-DAG) (Fig 9). Mature PLs can then be trafficked to other organelles, including the apicoplast. Loss of TgATS1 is therefore associated with defects in PL synthesis and apicoplast biogenesis and function, including FA synthesis. *T. gondii*, and potentially other

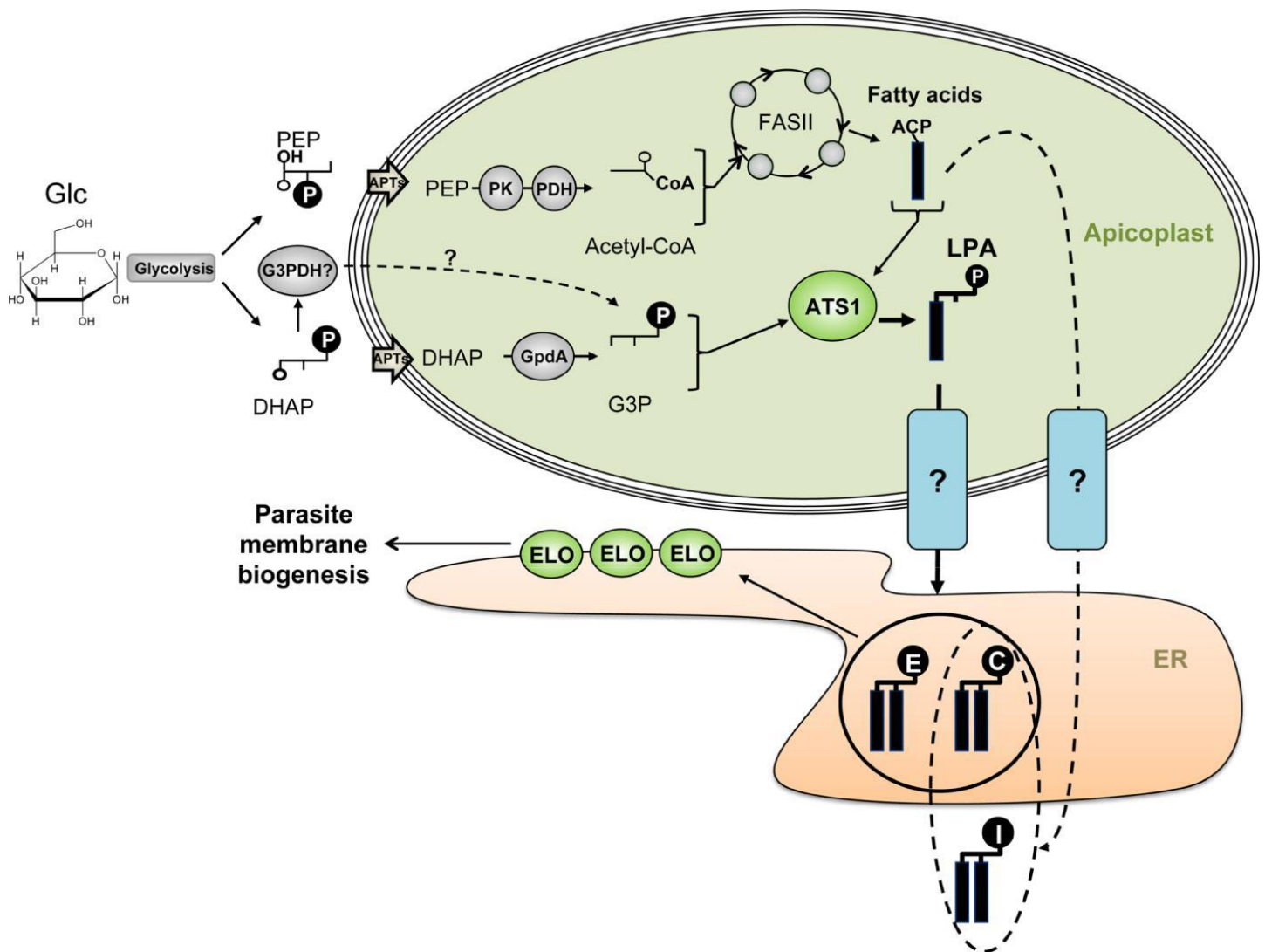


Fig 9. Proposed role of the apicoplast lipid assembly pathway. The glycolytic intermediates, dihydroxyacetone-phosphate (DHAP), and phosphoenolpyruvate (PEP) are imported into the apicoplast by the apicoplast phosphate transporter (APT) and converted to glycerol 3-phosphate (G3P) and acetyl-CoA, respectively. Acetyl-CoA is used by the FASII to generate, predominantly, C12 and C14 FA chains, which are transferred to G3P by TgATS1 to form lysophosphatidic acid (LPA). These LPA species are exported to the endoplasmic reticulum (ER) by an as yet unidentified transport system to generate bulk PC, PI and PE (shown as head groups with C, I and E, respectively). All PC, PI and PE species could then be elongated by elongase enzymes (ELO) before being exported to contribute to general parasite membrane biogenesis. Note: PI may also be assembled by PI synthase outside of the ER, most likely in the Golgi apparatus.

doi:10.1371/journal.ppat.1005765.g009

apicomplexan parasites, therefore appear to have redirected FASII/ATS1 pathways of FA/LPA synthesis from galactolipid biosynthesis (as occurs in plants and algal plastids) to PL synthesis for global membrane biogenesis. Although the precise location(s) of conversion of LPA to PA remains to be determined, it is clear that proteins involved in LPA synthesis and trafficking, including TgATS1, may be potential drug targets.

Materials and Methods

Sequence analysis, structure modelling, and phylogenetic analysis

A homology model of the TgATS1 structure was generated by threading the TgATS1 protein sequence (TGGT1_270910, www.toxodb.org) onto the crystal structure of CmATS1 (structure 1K30, www.rcsb.org, [47]) using Swissmodel (swissmodel.expasy.org, [65]) and Swiss PDB viewer. Robustness of the model was confirmed by a QMEAN4 score of 0.523 taking into account C-beta interaction energy, all atom pair-wise energy, solvation energy, and torsion angle energy [66]. Sequence alignments were generated using ClustalW using predicted protein sequences of TgATS1 (Toxodb.org, this work) PfATS1 (PF3D7_1318200, plasmodb.org), PyATS1 (PYYM_1420200, [44], plasmodb.org), CmATS1 [47, 67] and AtATS1 [68]. Secondary structure and putative residues involved in CmATS1 activity were retrieved from [47, 67]. Phylogenetic tree of ATS1 related protein was created using following proteins: Mycobacterium tuberculosis CKU11951.1 MtPlsB, Escherichia coli str. K-12 MG1655 AAC77011 EcPlsB, P. fal-ciparum PF3D7_1318200 putative PfATS1, P. yoelii PYYM_1420200 PyApiG3PAT, N. cani-num NCLIV_03587 putative NcATS1, Hammondia. hammondi HHA_270910 putative HhATS1, T. gondii TGME49_270910 TgATS1, Emerica tenella Houghton ETH_00020645 putative EtATS1, Chromera velia Cvel_26113 putative CvATS1, Vitrella brassicaformis Vbra_9602 putative VbATS1, Praelodactylum tricornutum EEC47678 putative PtATS1, C. moschata BAB17755.1 CmATS1, A. thaliana OAP16056.1 AtATS1, Thalassiosira pseudonana XP_002292905.1 putative TpATS1, Chlamydomonas reinhardtii XP_001694977.1 putative CrATS1, T. gondii TGGT1_256980 putative TgGPAT, P. falciparum PF3D7_1212500 PfERG-PAT, N. caninum NCLIV_029980 putative NcGPAT, P. berghei PBANKA_1428500 putative PbGPAT, H. Hammondi HHA_256980 putative HhGPAT, Sarcocystis neurona SRCN_2132 putative SnGPAT, E. tenella ETH_00014360 putative EtGPAT, Cryptosporidium parvum CAD98671.1 putative CpGPAT, Theileria annulata XP_954502.1 putative TaGPAT, V. brassicaformis Vbra_5531 putative VbGPAT, C. velia Cvel_20129 putative CvGPAT, T. pseudonana CNC02160 putative TpGPAT, A. thaliana AT1G01610 AtGPAT, Homo sapiens NP_065969 HsGPAT, Paramecium tetraurelia XP_001424966.1 putative PtGPAT, Tetrahymena thermo-phila XP_001022288.2 putative TtGPAT, Saccharomyces cerevisiae CAC85390.1 ScGPAT. The analysis was performed on the Phylogeny.fr platform [69]. First, these protein sequences were aligned by ClustalW. After alignment, positions with gaps were removed from the alignment. Then, the phylogenetic tree was reconstructed using the maximum likelihood method implemented in the PhyML program (v3.0). The default substitution model was selected assuming an estimated proportion of invariant sites and 10 gamma-distributed rate categories to account for rate heterogeneity across sites. The gamma shape parameter was estimated directly from the data. Reliability for internal branching was assessed using the aLRT test (minimum of SH-like and Chi2-based parametrics). Graphical representation and edition of the phylogenetic tree were performed with TreeDyn (v198.3).

T. gondii strains and cultures

T. gondii tachyzoites (RH-TATi and TgATS1-iKO) were maintained in human foreskin fibroblasts (HFF) using Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Life Technologies)

supplemented with 5% foetal bovine serum (Life Technologies), 2 mM glutamine and 25 µg/ml gentamicin at 37°C and 5% CO₂.

Construct design

The TgATS1 open reading frame was PCR amplified using primers 5'-GATCTGATCAAAAA TGCTTTTCTTTCTGGCTCGTCTCC and 5'-GATCTCTAGATTCGAAATGCGGAGTGA TAAGTTTGTACAG, digested with BclI and XbaI, and ligated into the BglIII and AvrII sites of vector pDt7s4H [51]. The resultant construct was transfected into TATi strain parasites and selected on pyrimethamine to produce the parental strain. This was subsequently cloned before characterisation. To disrupt the native TgATS1 locus, we amplified the CAT cassette from the vector piCG [70] using primers 5'-TCACGAACCGAAACGAAAAACGTCCAATCCCTCTT CACAGACGGCCCAGGATACGACTCACTATAGGGCGAATTGG and 5'-GTCAACGGA TCCGGTTGGCTGAACACACCGTTGTCGTCTTGCCGGTCTCCCTCGACTACGGCTTC CATTGGCAAC. The resultant products were introduced into the cosmid TOXO218 and TOXOX36 using a recombineering approach, as described previously [52]. The resultant modified cosmids were transfected into the parental parasite strain expressing regulated TgATS1, selected on chloramphenicol, and cloned out. Clones were screened for successful disruption of the native TgATS1 gene using primers 5'-GCAGCAATAGTTCTTTTCAGG and 5'-AGGCGT CTTCGTGCGTATC, which will only give a band if the native TgATS1 gene is present. To further verify knockout of the native TgATS1 gene, Southern blotting was performed as described previously [71] using a probe amplified with the same primers as for the PCR screen.

Antibodies and immunofluorescence assays

Primary anti-CPN60 (rabbit) antibodies [51] were used at a dilution of 1:3000, anti-IMC1 at 1:1000, anti-HA (Rat, Roche) at 1:500, and anti-ATRx1 (Mouse) at 1:1000. Secondary AlexaFluor 488- and 546-conjugated anti-rat and anti-rabbit antibodies (Life Technologies) were used at 1/10000 dilutions, respectively. Parasites were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde for 30 min on ice. Samples were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min on ice before blocking in PBS containing 3% BSA and incubation with primary antibodies then secondary antibodies diluted in the blocking solution. Labelled parasites were stained with Hoechst (1:10,000, Life Technologies) for 20 min and then washed three times in PBS then H₂O. Cover-slips were mounted onto slides prior to observation using a Zeiss epifluorescent microscope.

Electron microscopy

Intracellular tachyzoites were fixed in PBS containing 2.5% glutaraldehyde and 0.5% tannic acid (pH 7.2; Polysciences) for 15 min, followed by three washes in PBS. Samples were post-fixed in osmium tetroxide (OsO₄) in PBS for 2.5 min followed by three washes in PBS and water. Samples were stained overnight in 1% uranyl acetate, washed three times in water and dehydrated in a graded series of ethanol. Samples were embedded in LR white resin (London Resin) and ultrathin sections were observed on a Phillips Bio Twin (120 kV) electron microscope.

Phenotypic analyses

Plaque assays: HFF monolayers were infected with 500 parasites and allowed to develop under normal culture conditions for 10 days before staining with Crystal Violet (Sigma) and cell growth assessment by light microscopy for the presence of intact HFF.

Apicoplast quantification assay: TgATS1-iKO-FNR-RFP parasites were collected promptly after egress and inoculated onto new HFF monolayers and cultured for 0 to 6 days in the

presence or absence of ATc. At each time point cultures were fixed with paraformaldehyde and stained with anti-IMC1 and anti-HA. The numbers of parasites per vacuole were counted for more than 100 vacuoles for each condition at each point time. Apicoplast loss was determined by observing the fluorescent FNR-RFP protein as an apicoplast marker.

Intracellular growth assays: We introduced cytosolic tdTomato into TgATS1-iKO parasites and performed fluorescence growth assays as described previously [71].

Lipid extraction and analysis of *T. gondii* tachyzoites

Lipid extraction and analysis of tachyzoites was performed as previously described [12]. Intracellular tachyzoites (4×10^8 cell equivalents) were extracted in chloroform/methanol/water (1:3:1, v/v/v containing 50 nmol laurate (C12:0) as internal standard) for 1 h at 4°C, with periodic sonication. For MS analysis, polar and apolar metabolites were separated by phase partitioning. Total fatty acid analysis of the lipophilic fraction was analysed by GC-MS (fatty acids) and LC-MS (phospholipids). In all cases, lipids were extracted from the same cell number and experiments were repeated using each independent mutant line as a biological replicate.

Stable isotope labelling of *T. gondii* fatty acids and phospholipids

Stable isotope labelling using U-¹³C-glucose or U-¹³C-acetate (Cambridge Isotope Laboratories, USA), lipid extraction, and GC-MS analysis was performed as previously described [12, 53]. Briefly, freshly infected HFF were incubated in the presence or absence of ATc (0.5 μM, Sigma-Aldrich) in either glucose-free medium supplemented with 8 mM U-¹³C-glucose or low-glucose DMEM, supplemented with 8 mM U-¹³C-acetate. In TgATS1 repression experiments, the ¹³C-carbon source was added simultaneously with ATc. Other supplements (glutamine, sodium bicarbonate, and foetal bovine serum) were added according to normal culture conditions. Parasites were harvested at indicated time points and metabolites extracted and partitioned as above. An aliquot of the lipid extract was derivatised on-line using MethPrep II (Alltech) and the resulting fatty acid methyl esters were analysed by GC-MS as previously described [12, 53]. All fatty acids were identified by comparison of retention time and mass spectra with authentic chemical standards and label incorporation was calculated as the percent of the metabolite pool containing one or more ¹³C atoms after correction for natural abundance and the amount of ¹³C-carbon source in the culture medium (as determined by GC-MS analysis). In these experiments, U-¹³C-glucose or U-¹³C-acetate were added at the same time as ATc, and so the label incorporation observed in +ATc samples may be from the initial period before TgATS1 was fully absent.

Liquid chromatography-mass spectrometry analysis

Total lipids were extracted and partitioned as above. These extracts were suspended in 100 μL 1-butanol/10 mM ammonium formate in methanol (1:1, v/v) and 0.5 μL aliquots were analysed using the following LC-MS method. An Agilent 1290 series liquid chromatography (LC) system (maximum pressure 1200 bar) comprising a vacuum degasser, binary pump, column oven and temperature controlled autosampler was interfaced with a Jetstream electrospray ionization triple Quadrupole (Agilent 6490 QQQ) or Quadrupole Time-of-Flight (Agilent 6550 QTOF) mass spectrometer. The LC parameters were as follows: column: 2.1 × 100 mm, 1.8 μm C18 Zorbax Eclipse plus (Agilent); column temperature: 60°C; rate 0.6 mL/min. Gradient elution was from 45% mobile phase B to 100% B over 20 min, followed by 5 min at 100% B and a 3 min re-equilibration to 45% B. Mobile phase A: 10 mM ammonium formate in water; mobile phase B: water:acetonitrile:isopropanol, 5:20:75 (v/v/v) with 10 mM ammonium formate. The ESI source settings were: gas temperature: 250°C; gas flow rate: 20 L/min; nebulizer pressure:

45 psi; sheath gas temp: 350°C; sheath gas flow: 11 L/min; capillary voltage: 3000 V. In-spec-trum calibration of the QTOF data was performed using reference ions of 121.0508 m/z and 922.0097 m/z which were supplied through the second ESI needle. A 10,000-count threshold was set for untargeted MS/MS experiments. All solvents were LC-MS grade (Burdick and Jack-son) and 18.2 M Ω deionized water used.

The following scans were used for the three key lipid classes on the QQQ-MS: PC positive ionisation precursor scan of m/z 184, PE (and PE-Cer) positive ion neutral loss scan of 141 u, and PI negative ionisation precursor ion scan of m/z 241. These correlate to the relevant polar head groups. Data were analysed using Mass Hunter Qualitative (QTOF data) and Quantitative (QQQ data) software (Agilent).

PA quantification

Total lipid spiked with 25 nmol C13:0 fatty acid was extracted from U-¹³C-glucose labelled parasites prepared as above using chloroform:methanol, 1:2 (v/v) and chloroform:methanol, 2:1 (v/v) in the presence of 0.1 M HCl. Pooled organic phase was subjected to biphasic separation by adding 0.1 M HCl. The organic phase was dried under N₂ gas and dissolved in 1-butanol. Total lipid was then separated by 2D-HPTLC with 1 μ g PA(C17:0/C17:0) (Avanti Polar lipids) using chloroform/methanol/28% NH₄OH, 60:35:8 (v/v) as the 1st dimension solvent system and chloroform/acetone/methanol/acetic acid/water, 50:20:10:13:5 (v/v) as the 2nd dimension solvent system [72]. The spot corresponding to PA was identified according to the migration of authentic PA standard, and subsequently extracted for GC-MS analysis (Agilent 5977A-7890B) after methanolysis using 0.5 M HCl in methanol incubated at 100°C for 1 h. Fatty acid methyl esters were identified by their mass spectrum and retention time compared to authentic standards. PA content was normalized according to the parasite cell number and internal standard.

Supporting Information

S1 Fig. Related to Fig 1: A three-dimensional structure of TgATS1 was generated using CmATS1 as a model [47]. (A) The overall structure as observed in the ribbon representation of CmATS1 α -carbons. Surface accessibility (B) and residues involved in substrate binding (G3P and acyl-ACP) and the catalytic motif NHX4D (C) of CmATS1. The structure (D), surface accessibility (E), and residues and motifs (F) are conserved and highly similar in TgATS1, forming similar grooves and pockets to those found in CmATS1 (G) Phylogeny of *T. gondii* ATS1. Maximum likelihood phylogenies for the glycerol acyl transferases of 32 species. Branch support values are indicated in different colors (0–25, purple; 25–50, green; 50–75, orange; 75–100, red). The distance between each node is indicated in the Fig. (TIF)

S2 Fig. Related to Fig 2: Deletion and isolation of a conditional TgATS1 mutant by pro-moter replacement in the TATi transactivator line. Schematic representation of the two-step genome modification used to obtain a conditional TgATS1 mutant. (A) The TgATS1 sequence was fused (i) to a HA-tag coding sequence at its 3'-terminus and (ii) to the tetracycline inducible promoter sequence (Pi) at its 5'-terminus (iTgATS1). The construct was transfected and randomly inserted into the TATi line genome, prior to endogenous gene (eTgATS1) replacement by a Chloramphenicol Acyltransferase (CAT) resistance cassette [73] via double homologous recombination using a specific CAT ATS1 KO cosmid [74]. Probes and restriction sites used for Southern blot are indicated by arrowheads and restriction enzymes (RE) names, respectively. (B) Schematic representation of homologous recombination between the CAT KO

cosmid and TgATS1 locus. Probe and restriction sites used for Southern blot are indicated by arrowheads and RE names. (C) PCR confirms loss of endogenous copy of eTgATS1 (arrows showing the positive clones). (D) Southern blot analysis of the iTgATS1/ TgATS1 clone and its parental iTgATS1/eTgATS1 line confirming eTgATS1 disruption presence of iTgATS1. (TIF)

S3 Fig. Related to Fig 2: Real time fluorescence assay of TgATS1-iKO intracellular growth. Parasite growth rate was analysed over the course of 8 days by quantifying the fluorescence of tdTomato [71] expressed in the cytosol of TgATS1-iKO parasites in the absence (blue rectangles, control) or the presence of ATc. TgATS1-iKO were grown in the presence of ATc from day 0 to day 8 (red squares) or pre-treated with ATc for 3 days prior to the 8 day ATc treatment (green triangles). In the absence of ATc, TgATS1-iKO grew normally as observed by fluorescence levels but the presence of ATc substantially affected the amount of fluorescence, with this effects being strongest with 3 days of pre-treatment. (TIF)

S4 Fig. Related to Fig 5: Analysis of FASII fatty acid biosynthesis in TgATS1-iKO parasites by 1 day U-¹³C-glucose metabolic labelling using stable isotope precursors. Tachyzoites of *T. gondii* conditional mutants for ATS1 were labelled with U-¹³C-glucose for 1 day in the presence or absence of ATc. Lipids were extracted, derivatized, and the resulting FAMES were analysed by GC-MS to determine ¹³C incorporation. (A) The mean label incorporation from U-¹³C-glucose into fatty acids is shown for parasites grown in the absence (dark red) and presence (light red) of ATc. (B) The MIDs for C14:0 labelled with U-¹³C-glucose in the presence (red) and absence (pale red) of ATc. The x-axis indicates the number of ¹³C atoms in each FAMES ('m0' indicates the monoisotopic mass containing no ¹³C atoms, while 'mX' represents that mass with 'X' ¹³C atoms incorporated). Nomenclature Cx:y is shown where x is the number of carbons and y is the number of double bonds in the fatty acid chain. Error bars indicate standard deviation, where n = 2 biological replicates. Data shown has been background-subtracted for natural isotope abundance. (TIF)

S5 Fig. Related to Fig 5: Analysis of FASII fatty acid biosynthesis and elongation in TgATS1-iKO parasites by metabolic labelling using U-¹³C-glucose. Tachyzoites of *T. gondii* conditional mutants for TgATS1 were labelled with U-¹³C-glucose in the presence or absence of ATc. Lipids were extracted, derivatized, and the resulting fatty acid methyl esters (FAMES) were analysed by GC-MS to determine isotope incorporation. MIDs for all detected FAMES labelled with U-¹³C-glucose in the absence and presence of ATc are shown in red and pale red, respectively. The x-axis indicates the number of ¹³C atoms in each FAMES ('m0' indicates the monoisotopic mass containing no ¹³C atoms, while 'mX' represents that mass with 'X' ¹³C atoms incorporated). Nomenclature Cx:y is shown where x is the number of carbons and y is the number of double bonds in the fatty acid chain. Error bars indicate standard deviation, where n = 4 biological replicates. Data shown has been background-subtracted for natural isotope abundance. (TIF)

S6 Fig. Related to Fig 5: Analysis of elongation (and fatty acid biosynthesis) in TgATS1-iKO parasites by metabolic labelling using U-¹³C-acetate. Tachyzoites of TgATS1-iKO parasites were labelled with ¹³C-U-acetate in the presence or absence of ATc. Lipids were extracted, derivatized, and the resulting FAMES were analysed by GC-MS to determine isotope incorporation. MIDs for all detected FAMES labelled with U-¹³C-acetate in the absence and presence of ATc are shown in purple and pale purple, respectively. MIDs suggested that saturated/

monounsaturated FAs incorporated ^{13}C -atoms onto C16:0 or C14:0 in a units of two (i.e. C18 incorporated 2 or 4, C20 incorporated 4 or 6, C22 incorporated 6 or 8, and C24 incorporated 8 or 10 ^{13}C -atoms onto C16:0 or C14:0, respectively). The x-axis indicates the number of ^{13}C atoms in each FAME ('m0' indicates the monoisotopic mass containing no ^{13}C atoms, while 'mX' represents that mass with 'X' ^{13}C atoms incorporated). Nomenclature Cx:y is shown where x is the number of carbons and y is the number of double bonds in the fatty acid chain. Error bars indicate standard deviation, where n = 4 biological replicates. Data shown has been background-subtracted for natural isotope abundance.

(TIF)

S7 Fig. Related to Fig 6: Representative MS/MS fragmentation confirms the presence of a ^{13}C -labelled LPA backbone in PI. (A) Negative ion mode MS/MS fragmentation of unlabelled PI(36:4), m/z 857.51, extracted from TgATS1-HA-iKO cells grown in the absence of ATc. Characteristic fragment ions were detected as follows: LPA(20:4), m/z 439.22; LPA(16:0), m/z 391.22; FA(C20:4), m/z 303.23; FA(C16:0), m/z 255.28; inositol phosphate, m/z 241.01; glycerol 3-phosphate (G3P), m/z 152.99. (B) Equivalent MS/MS fragmentation of ^{13}C -labelled PI(36:4), m/z 876.5711. Fragment ions corresponding to labelled and unlabelled moieties were observed as follows: LPA(20:4) containing labelled G3P, m/z 442.22; LPA(16:0) containing labelled G3P and labelled C16:0, m/z 410.29; labelled C16:0, m/z 271.28; G3P M+3, m/z 156.00.

(TIF)

S8 Fig. Related to Fig 6: High-resolution chromatography allows intra-class separation of PL species. Chromatograms of PC, PE and PI extracted from TgATS1-HA-iKO parasites grown for four days in unlabelled conditions (black line) or ^{13}C -glucose-labelled conditions in the absence (red line) or presence (green line) of ATc. (A) Total ion chromatogram from m/z 184 precursor ion scan in positive mode (for PC). (B) Total ion chromatogram from m/z 241 precursor ion scan in negative mode (for PI). (C) Total ion chromatogram from 141 u neutral loss scan in positive mode (for PE).

(TIF)

S9 Fig. Related to Fig 6: Representative MS/MS fragmentation confirms the presence of a ^{13}C -labelled moieties in PC. (A) Chromatogram of PC species determined by m/z 184 precursor ion scanning in positive mode for parental strain (black line) and TgATS1-iKO grown with U- ^{13}C -glucose in the absence of ATc (red line). PC(30:0) elutes at 13.27 min (blue frame). (B, C) Corresponding mass spectra and extracted ion chromatograms of PC eluting at 13.27 min. (B) A single peak of m/z 706.54 corresponding to PC(30:0) elutes in the parental strain (black line), whereas a series of peaks ranging from m/z 706.54 to 739.6 elute in the U- ^{13}C -glucose-labelled TgATS1-iKO (red line). (C) Extracted ion chromatogram of marked ion peaks from (B) all overlap precisely at 13.27 min (arrowheads) and they have similar peak shapes, indicating that they are isotopologues of the same molecule. (D) Putative PC(30:0) isotopologue structures of the multiple 13.27 min ion peaks from labelled TgATS1-iKO as follows: m/z 706.54, unlabelled PC(30:0); m/z 709.56, PC(30:0) containing labelled G3P; m/z 721.59, PC(30:0) containing labelled G3P and C14:0 labelled with 12 ^{13}C atoms; m/z 723.59, PC(30:0) containing fully-labelled LPA(14:0); and m/z 737.64 PC(30:0) containing labelled G3P, fully-labelled C14:0 and C16:0 labelled with 14 ^{13}C atoms. The m/z 737.64 ion may also represent PC(30:0) containing labelled G3P, fully-labelled C16:0 and C14:0 labelled with 12 ^{13}C atoms. (E, F) Representative MS/MS fragmentation of annotated PC molecules. This confirmed that all ^{13}C -labelled molecules observed in the spectrum were PC(30:0) by detection of typical m/z 184 phosphocholine polar head.

(TIF)

S10 Fig. Related to Fig 6: LC-MS/MS structure confirmation of PE-Ceramide(d18:1/16:0) (A) Fragmentation of m/z 661.52 confirmed the assignment of the peak as PE-Cer(d18:1/16:0) by detection of the characteristic ions of ceramide and ethanolamine head group in positive mode: m/z 142 corresponds to ethanol amine phosphate; m/z 520.50 to sphingosine (d18:1/16:0) and m/z 264.2 to ceramide. (B) MIDs of PE-Cer(d18:1/16:0) extracted from TgATS1-iKO parasites grown in unlabelled conditions (black bars) or labelled with U- ^{13}C -glucose for 4 days in the absence (white bars) or presence of ATc (grey bars). 'm0' indicates the monoisotopic mass containing no ^{13}C atoms, while 'mX' represents that mass with 'X' ^{13}C atoms incorporated. (C) Relative abundances of apicoplast-generated FA moieties (i.e. those containing 4 or more ^{13}C atoms) in PE-Cer(d18:1/16:0) extracted from TgATS1-iKO parasites grown in the presence and absence of ATc shows that the majority of FA is generated in the apicoplast and was not greatly affected by the disruption of TgATS1. (TIF)

S11 Fig. Related to Fig 6: MS/MS fragmentation of undetermined species detected by precursor ion scan for m/z 241 in negative mode suggests precursor ions corresponding to PE. (A) Negative ion mode MS/MS fragmentation of m/z 736.4879 eluting at 13.94 min reveals the presence of ions corresponding to FA(C22:5), m/z 329.24; FA(C20:4), m/z 303.23; FA(C16:1), m/z 253.21; and FA(C14:0), m/z 227.19. (B) Detail from panel A. Presence of a m/z 140.01 ion suggests that this ion could be a mix of PE(16:1/20:4) and PE(14:0/22:5). (C) Negative ion mode MS/MS fragmentation of m/z 790.5364 eluting at 15.16 min revealed the presence of ions corresponding to FA(C22:5), m/z 329.24; FA(C18:1), m/z 281.24; and, potentially, etha-nolamine-phosphate, m/z 140.01. This suggests that the mass m/z 790.5364 corresponds to PE (18:1/22:5). (TIF)

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Mike Blackman for helpful comments on the manuscript and EFS (Etablissement du Sang Français) Grenoble.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CYB SA YYB JIM GGvD. Performed the experiments: SA CYB YYB DD JIM DLC GGvD MJS GIM. Analyzed the data: SA JIM DLC YYB CYB. Contributed reagents/materials/analysis tools: EM MJM MFCD GIM YYB CYB. Wrote the paper: CYB JIM SA YYB GIM MJM.

References

1. McFadden GI, Reith ME, Munholland J, Lang-Unnasch N. Plastid in human parasites. *Nature*. 1996; 381(6582):482. PMID: [8632819](#)
2. Wilson RJ, Williamson DH. Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997; 61(1):1–16. PMID: [9106361](#); PubMed Central PMCID: [PMCPMC232597](#).
3. Kohler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJ, et al. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science*. 1997; 275(5305):1485–9. PMID: [9045615](#).
4. Waller RF, Keeling PJ, Donald RG, Striepen B, Handman E, Lang-Unnasch N, et al. Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(21):12352–7. PMID: [9770490](#); PubMed Central PMCID: [PMCPMC22835](#).
5. Fichera ME, Roos DS. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature*. 1997; 390(6658):407–9. PMID: [9389481](#)
6. He CY, Shaw MK, Pletcher CH, Striepen B, Tilney LG, Roos DS. A plastid segregation defect in the pro-tozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *EMBO J*. 2001; 20(3):330–9. PMID: [11157740](#)

7. Botté CY, Dubar F, McFadden GI, Maréchal E, Biot C. Plasmodium falciparum apicoplast drugs: targets or off-targets? *Chem Rev.* 2012; 112(3):1269–83. doi: [10.1021/cr200258w](https://doi.org/10.1021/cr200258w) PMID: [22026508](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22026508/)
8. Macrae JI, Maréchal E, Biot C, Botté CY. The apicoplast: a key target to cure malaria. *Curr Pharm Des.* 2012; 18(24):3490–504. PMID: [22607142](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22607142/)
9. Vial HJ, Ancelin ML, Philippot JR, Thuét MJ. Biosynthesis and dynamics of lipids in Plasmodium-infected mature mammalian erythrocytes. *Blood Cells.* 1990; 16(2–3):531–55; discussion 56–61. PMID: [2257325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2257325/).
10. Shears MJ, Botte CY, McFadden GI. Fatty acid metabolism in the Plasmodium apicoplast: Drugs, doubts and knockouts. *Mol Biochem Parasitol.* 2015; 199(1–2):34–50. PMID: [25841762](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25841762/) doi: [10.1016/j.molbiopara.2015.03.004](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.03.004)
11. Mazumdar J, H Wilson E, Masek K, C AH, B S. Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(35):13192–7. PMID: [16920791](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16920791/)
12. Ramakrishnan S, Docampo MD, Macrae JI, Pujol FM, Brooks CF, van Dooren GG, et al. Apicoplast and endoplasmic reticulum cooperate in fatty acid biosynthesis in apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 2012; 287(7):4957–71. doi: [10.1074/jbc.M111.310144](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.310144) PMID: [22179608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22179608/)
13. van Schaijk BCL, Kumar TRS, Vos MW, Richman A, van Gemert G-J, Li T, et al. Type II fatty acid biosynthesis is essential for Plasmodium falciparum sporozoite development in the midgut of Anopheles mosquitoes. *Eukaryot Cell.* 2014; 13(5):550–9. doi: [10.1128/EC.00264-13](https://doi.org/10.1128/EC.00264-13) PMID: [24297444](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24297444/)
14. Yu M, Kumar TR, Nkrumah LJ, Coppi A, Retzlaff S, Li CD, et al. The fatty acid biosynthesis enzyme FabI plays a key role in the development of liver-stage malarial parasites. *Cell Host Microbe.* 2008; 4(6):567–78. doi: [10.1016/j.chom.2008.11.001](https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.11.001) PMID: [19064257](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19064257/); PubMed Central PMCID: PMC2646117.
15. Vaughan AM, O’Neill MT, Tarun AS, Camargo N, Phuong TM, Aly ASI, et al. Type II fatty acid synthesis is essential only for malaria parasite late liver stage development. *Cell Microbiol.* 2009; 11(3):506–20. doi: [10.1111/j.1462-5822.2008.01270.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01270.x) PMID: [19068099](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19068099/)
16. Welti R, Mui E, Sparks A, Wernimont S, Isaac G, Kirisits M, et al. Lipidomic analysis of *Toxoplasma gondii* reveals unusual polar lipids. *Biochemistry.* 2007; 46(48):13882–90. PMID: [17988103](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17988103/)
17. Botté CY, Yamaryo-Botte Y, Rupasinghe TWT, Mullin KA, Macrae JI, Spurck TP, et al. Atypical lipid composition in the purified relict plastid (apicoplast) of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(18):7506–11. doi: [10.1073/pnas.1301251110](https://doi.org/10.1073/pnas.1301251110) PMID: [23589867](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23589867/)
18. Déchamps S, Wengelnik K, Berry-Sterkers L, Cerdan R, Vial HJ, Gannoun-Zaki L. The Kennedy phos-pholipid biosynthesis pathways are refractory to genetic disruption in *Plasmodium berghei* and therefore appear essential in blood stages. *Mol Biochem Parasitol.* 2010; 173(2):69–80. doi: [10.1016/j.molbiopara.2010.05.006](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.05.006) PMID: [20478340](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20478340/)
19. Coppens I. Targeting lipid biosynthesis and salvage in apicomplexan parasites for improved chemotherapies. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11(12):823–35. doi: [10.1038/nrmicro3139](https://doi.org/10.1038/nrmicro3139) PMID: [24162026](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24162026/).
20. Ben Mamoun C, Prigge ST, Vial H. Targeting the lipid metabolic pathways for the treatment of malaria. *Drug Dev Res.* 2010; 71(1):44–55. PMID: [20559451](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20559451/)
21. Charron AJ, Sibley LD. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* 2002; 115(Pt 15):3049–59. PMID: [12118061](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12118061/)
22. Gupta N, Zahn MM, Coppens I, Joiner KA, Voelker DR. Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* arrests its growth. *J Biol Chem.* 2005; 280(16):16345–53. doi: [10.1074/jbc.M501523200](https://doi.org/10.1074/jbc.M501523200) PMID: [15708856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15708856/).
23. Caldarelli SA, Duckert J-F, Wein S, Calas M, Périgaud C, Vial H, et al. Synthesis and evaluation of bis-thiazolium salts as potential antimalarial drugs. *ChemMedChem.* 2010; 5(7):1102–9. doi: [10.1002/cmdc.201000097](https://doi.org/10.1002/cmdc.201000097) PMID: [20540062](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20540062/)
24. Itoe MA, Sampaio JL, Cabal GG, Real E, Zuzarte-Luis V, March S, et al. Host cell phosphatidylcholine is a key mediator of malaria parasite survival during liver stage infection. *Cell Host Microbe.* 2014; 16(6):778–86. doi: [10.1016/j.chom.2014.11.006](https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.006) PMID: [25498345](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25498345/)
25. Bobenchik AM, Witola WH, Augagneur Y, Nic Lochlainn L, Garg A, Pachikara N, et al. Plasmodium falciparum phosphoethanolamine methyltransferase is essential for malaria transmission *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(45):18262–7. doi: [10.1073/pnas.1313965110](https://doi.org/10.1073/pnas.1313965110) PMID: [24145416](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24145416/); PubMed Central PMCID: PMC3831454.
26. Degardin M, Wein S, Duckert JF, Maynadier M, Guy A, Durand T, et al. Development of the first oral bio-precursors of bis-alkylguanidine antimalarial drugs. *ChemMedChem.* 2014; 9(2):300–4. doi: [10.1002/cmdc.201300419](https://doi.org/10.1002/cmdc.201300419) PMID: [24403182](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24403182/).

27. Vial HJ, Wein S, Farenc C, Kocken C, Nicolas O, Ancelin ML, et al. Prodrugs of bithiazolium salts are orally potent antimalarials. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(43):15458–63. doi: [10.1073/pnas.0404037101](https://doi.org/10.1073/pnas.0404037101) PMID: 15492221; PubMed Central PMCID: PMC523447.
28. Tawk I, Chicanne G, Dubremetz J-F, Richard V, Payrastra B, Vial HJ, et al. Phosphatidylinositol 3-phosphate, an essential lipid in *Plasmodium*, localizes to the food vacuole membrane and the apicoplast. *Eukaryotic Cell*. 2010; 9(10):1519–30. doi: [10.1128/EC.00124-10](https://doi.org/10.1128/EC.00124-10) PMID: 20709789; PubMed Central PMCID: PMC2950420.
29. Tawk I, Dubremetz J-F, Montcourrier P, Chicanne G, Merezegue F, Richard V, et al. Phosphatidylinositol 3-monophosphate is involved in *Toxoplasma* apicoplast biogenesis. *PLoS Pathog*. 2011; 7(2): e1001286. doi: [10.1371/journal.ppat.1001286](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001286) PMID: 21379336
30. McNamara CW, Lee MC, Lim CS, Lim SH, Roland J, Nagle A, et al. Targeting *Plasmodium* PI(4)K to eliminate malaria. *Nature*. 2013; 504(7479):248–53. doi: [10.1038/nature12782](https://doi.org/10.1038/nature12782) PMID: 24284631
31. Macrae JI, Lopaticki S, Maier AG, Rupasinghe T, Nahid A, Cowman AF, et al. *Plasmodium falciparum* is dependent on de novo myo-inositol biosynthesis for assembly of GPI glycolipids and infectivity. *Mol Microbiol*. 2014; 91(4):762–76. doi: [10.1111/mmi.12496](https://doi.org/10.1111/mmi.12496) PMID: 24350823.
32. Dechamps S, Shastri S, Wengelnik K, Vial HJ. Glycerophospholipid acquisition in *Plasmodium*—a puzzling assembly of biosynthetic pathways. *Int J Parasitol*. 2010; 40(12):1347–65. doi: [10.1016/j.ijpara.2010.05.008](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.05.008) PMID: 20600072.
33. Ohlrogge J, Browse J. Lipid biosynthesis. *Plant Cell*. 1995; 7(7):957–70. PMID: 7640528
34. Déchamps S, Maynadier M, Wein S, Gannoun-Zaki L, Maréchal E, Vial HJ. Rodent and nonrodent malaria parasites differ in their phospholipid metabolic pathways. *J Lipid Res*. 2010; 51(1):81–96. doi: [10.1194/jlr.M900166-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.M900166-JLR200) PMID: 19561325
35. Phosphatidylethanolamine synthesis in the parasite mitochondrion is required for efficient growth but dispensable for survival of *Toxoplasma gondii*. (2014).
36. Botté CY, Maréchal E. Plastids with or without galactoglycerolipids. *Trends Plant Sci*. 2014; 19(2):71–8. doi: [10.1016/j.tplants.2013.10.004](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.10.004) PMID: 24231068
37. Petroutsos D, Amiar S, Abida H, Dolch L-J, Bastien O, Rébeillé F, et al. Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways—From cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids. *Prog Lipid Res*. 2014; 54:68–85. doi: [10.1016/j.plipres.2014.02.001](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.02.001) PMID: 24594266
38. Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J, et al. Chloroplast proteomics highlights the subcellular compartmentation of lipid metabolism. *Prog Lipid Res*. 2010; 49(2):128–58. doi: [10.1016/j.plipres.2009.10.003](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.10.003) PMID: 19879895
39. Botté C, Saïdani N, Mondragon R, Mondragón M, Isaac G, Mui E, et al. Subcellular localization and dynamics of a digalactolipid-like epitope in *Toxoplasma gondii*. *J Lipid Res*. 2008; 49(4):746–62. doi: [10.1194/jlr.M700476-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.M700476-JLR200) PMID: 18182683
40. Botté CY, Deligny M, Rocchia A, Bonneau A-L, Saïdani N, Hardré H, et al. Chemical inhibitors of mono-galactosyldiacylglycerol synthases in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Chem Biol*. 2011; 7(11):834–42. doi: [10.1038/nchembio.658](https://doi.org/10.1038/nchembio.658) PMID: 21946275
41. Ralph SA, van Dooren GG, Waller RF, Crawford MJ, Fraunholz MJ, Foth BJ, et al. Tropical infectious diseases: Metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2(3):203–16. PMID: 15083156
42. Dubots E, Botté C, Boudière L, Yamaryo-Botte Y, Jouhet J, Maréchal E, et al. Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis. *Biochimie*. 2012; 94(1):86–93. doi: [10.1016/j.biochi.2011.03.012](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.03.012) PMID: 21501653
43. Bisanz C, Bastien O, Grando D, Jouhet J, Maréchal E, Cesbron-Delauw M-F. *Toxoplasma gondii* acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors. *Biochem J*. 2006; 394(1):197–205.
44. Lindner SE, Sartain MJ, Hayes K, Harupa A, Moritz RL, Kappe SH, et al. Enzymes involved in plastid-targeted phosphatidic acid synthesis are essential for *Plasmodium yoelii* liver-stage development. *Mol Microbiol*. 2014; 91(4):679–93. doi: [10.1111/mmi.12485](https://doi.org/10.1111/mmi.12485) PMID: 24330260; PubMed Central PMCID: PMC3925071.
45. Santiago TC, Zufferey R, Mehra RS, Coleman RA, Mamoun CB. The *Plasmodium falciparum* PfGatp is an endoplasmic reticulum membrane protein important for the initial step of malarial glycerolipid synthesis. *J Biol Chem*. 2004; 279(10):9222–32. PMID: 14668349
46. Gunther S, Wallace L, Patzewitz EM, McMillan PJ, Storm J, Wrenger C, et al. Apicoplast lipopeptide synthase is not essential for *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog*. 2007; 3(12):e189. Epub 2007/12/12. PMID: 18069893; PubMed Central PMCID: PMC2134950.

47. Turnbull AP, Rafferty JB, Sedelnikova SE, Slabas AR, Schierer TP, Kroon JT, et al. Analysis of the structure, substrate specificity, and mechanism of squash glycerol-3-phosphate (1)-acyltransferase. *Structure*. 2001; 9(5):347–53. PMID: [11377195](#).
48. Tamada T, Feese MD, Ferri SR, Kato Y, Yajima R, Toguri T, et al. Substrate recognition and selectivity of plant glycerol-3-phosphate acyltransferases (GPATs) from *Cucurbita moscata* and *Spinacea oleracea*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004; 60(Pt 1):13–21. PMID: [14684887](#).
49. Heath RJ, Rock CO. A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis. *J Bacteriol*. 1998; 180(6):1425–30. PMID: [9515909](#)
50. Foth BJ, Ralph SA, Tonkin CJ, Struck NS, Fraunholz M, Roos DS, et al. Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. 2003; 299(5607):705–8. doi: [10.1126/science.1078599](#) PMID: [12560551](#).
51. Agrawal S, van Dooren GG, Beatty WL, Striepen B. Genetic evidence that an endosymbiont-derived endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD) system functions in import of apicoplast proteins. *J Biol Chem*. 2009; 284(48):33683–91. doi: [10.1074/jbc.M109.044024](#) PMID: [19808683](#); PubMed Central PMCID: PMC2785210.
52. Brooks CF, Johnsen H, van Dooren GG, Muthalagi M, Lin SS, Bohne W, et al. The toxoplasma apico-plast phosphate translocator links cytosolic and apicoplast metabolism and is essential for parasite survival. *Cell Host Microbe*. 2010; 7(1):62–73. doi: [10.1016/j.chom.2009.12.002](#) PMID: [20036630](#); PubMed Central PMCID: PMC3013619.
53. Macrae JI, Sheiner L, Nahid A, Tonkin C, Striepen B, McConville MJ. Mitochondrial metabolism of glucose and glutamine is required for intracellular growth of *Toxoplasma gondii*. *Cell Host Microbe*. 2012; 12(5):682–92. doi: [10.1016/j.chom.2012.09.013](#) PMID: [23159057](#)
54. Ramakrishnan S, Docampo MD, Macrae JI, Ralton JE, Rupasinghe T, McConville MJ, et al. The intracellular parasite *Toxoplasma gondii* depends on the synthesis of long-chain and very long-chain unsaturated fatty acids not supplied by the host cell. *Mol Microbiol*. 2015; 97(1):64–76. doi: [10.1111/mmi.13010](#) PMID: [25825226](#)
55. Arroyo-Olarte RD, Brouwers JF, Kuchipudi A, Helms JB, Biswas A, Dunay IR, et al. Phosphatidylthreonine and lipid-mediated control of parasite virulence. *PLoS Biol*. 2015; 13(11):e1002288. doi: [10.1371/journal.pbio.1002288](#) PMID: [26565995](#)
56. Kunst L, Browse J, Somerville C. Altered regulation of lipid biosynthesis in a mutant of *Arabidopsis* deficient in chloroplast glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85(12):4143–7. PMID: [16593939](#)
57. Xu C, Yu B, Cornish AJ, Froehlich JE, Benning C. Phosphatidylglycerol biosynthesis in chloroplasts of *Arabidopsis* mutants deficient in acyl-ACP glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Plant J*. 2006; 47(2):296–309. PMID: [16774646](#)
58. Pratt S, Wansadhipathi-Kannangara NK, Bruce CR, Mina JG, Shams-Eldin H, Casas J, et al. Sphingolipid synthesis and scavenging in the intracellular apicomplexan parasite, *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. 2013; 187(1):43–51. doi: [10.1016/j.molbiopara.2012.11.007](#) PMID: [23246819](#)
59. Jouhet J, Maréchal E, Block MA. Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells. *Prog Lipid Res*. 2007; 46(1):37–55. PMID: [16970991](#)
60. Tomova C, Humbel BM, Geerts WJ, Entzeroth R, Holthuis JC, Verkleij AJ. Membrane contact sites between apicoplast and ER in *Toxoplasma gondii* revealed by electron tomography. *Traffic*. 2009; 10(10):1471–80. doi: [10.1111/j.1600-0854.2009.00954.x](#) PMID: [19602198](#).
61. Benning C. Mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2009; 25:71–91. doi: [10.1146/annurev.cellbio.042308.113414](#) PMID: [19572810](#)
62. Protein import and the origin of red complex plastids., (2015).
63. Bullen HE, Jia Y, Yamaryo-Botte Y, Bisio H, Zhang O, Jemelin NK, et al. Phosphatidic acid-mediated signaling regulates microneme secretion in *Toxoplasma*. *Cell Host and Microbe*. 2016:1–14.
64. Kong P, Brouwers JF, Lucius R, Gupta N. Two phylogenetically distinct CDP-DAG synthases located in the endoplasmic reticulum and apicoplast cooperate to ensure membrane biogenesis in *Toxoplasma gondii*. 27th Annual meeting of the German society of Parasitology; Göttingen, Germany.2016.
65. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 2006; 22(2):195–201. doi: [10.1093/bioinformatics/bti770](#) PMID: [16301204](#)
66. Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*. 2011; 27(3):343–50. doi: [10.1093/bioinformatics/btq662](#) PMID: [21134891](#)
67. Slabas AR, Kroon JT, Scheierer TP, Gilroy JS, Hayman M, Rice DW, et al. Squash glycerol-3-phosphate (1)-acyltransferase. Alteration of substrate selectivity and identification of arginine and lysine residues

- important in catalytic activity. *J Biol Chem.* 2002; 277(46):43918–23. doi: [10.1074/jbc.M206429200](https://doi.org/10.1074/jbc.M206429200) PMID: 12205087.
68. Nishida I, Tasaka Y, Shiraishi H, Murata N. The gene and the RNA for the precursor to the plastid-located glycerol-3-phosphate acyltransferase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 1993; 21(2):267–77. PMID: 7678766.
 69. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist., (2008).
 70. Agrawal S, Chung D-WD, Ponts N, van Dooren GG, Prudhomme J, Brooks CF, et al. An apicoplast localized ubiquitylation system is required for the import of nuclear-encoded plastid proteins. *PLoS Pathog.* 2013; 9(6):e1003426. doi: [10.1371/journal.ppat.1003426](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003426) PMID: 23785288
 71. van Dooren GG, Tomova C, Agrawal S, Humbel BM, Striepen B. *Toxoplasma gondii* Tic20 is essential for apicoplast protein import. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(36):13574–9. doi: [10.1073/pnas.0803862105](https://doi.org/10.1073/pnas.0803862105) PMID: 18757752
 72. Tanaka T, Kassai A, Ohmoto M, Morito K, Kashiwada Y, Takaishi Y, et al. Quantification of phosphatidic acid in foodstuffs using a thin-layer-chromatography-imaging technique. *J Agric Food Chem.* 2012; 60(16):4156–61. doi: [10.1021/jf300147y](https://doi.org/10.1021/jf300147y) PMID: 22475031
 73. Meissner M, Schluter D, Soldati D. Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science.* 2002; 298(5594):837–40. doi: [10.1126/science.1074553](https://doi.org/10.1126/science.1074553) PMID: 12399593.
 74. Gubbels M-J, Lehmann M, Muthalagi M, Jerome ME, Brooks CF, Szatanek T, et al. Forward genetic analysis of the apicomplexan cell division cycle in *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 2008; 4(2):e36. doi: [10.1371/journal.ppat.0040036](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040036) PMID: 18282098

Fig. S1

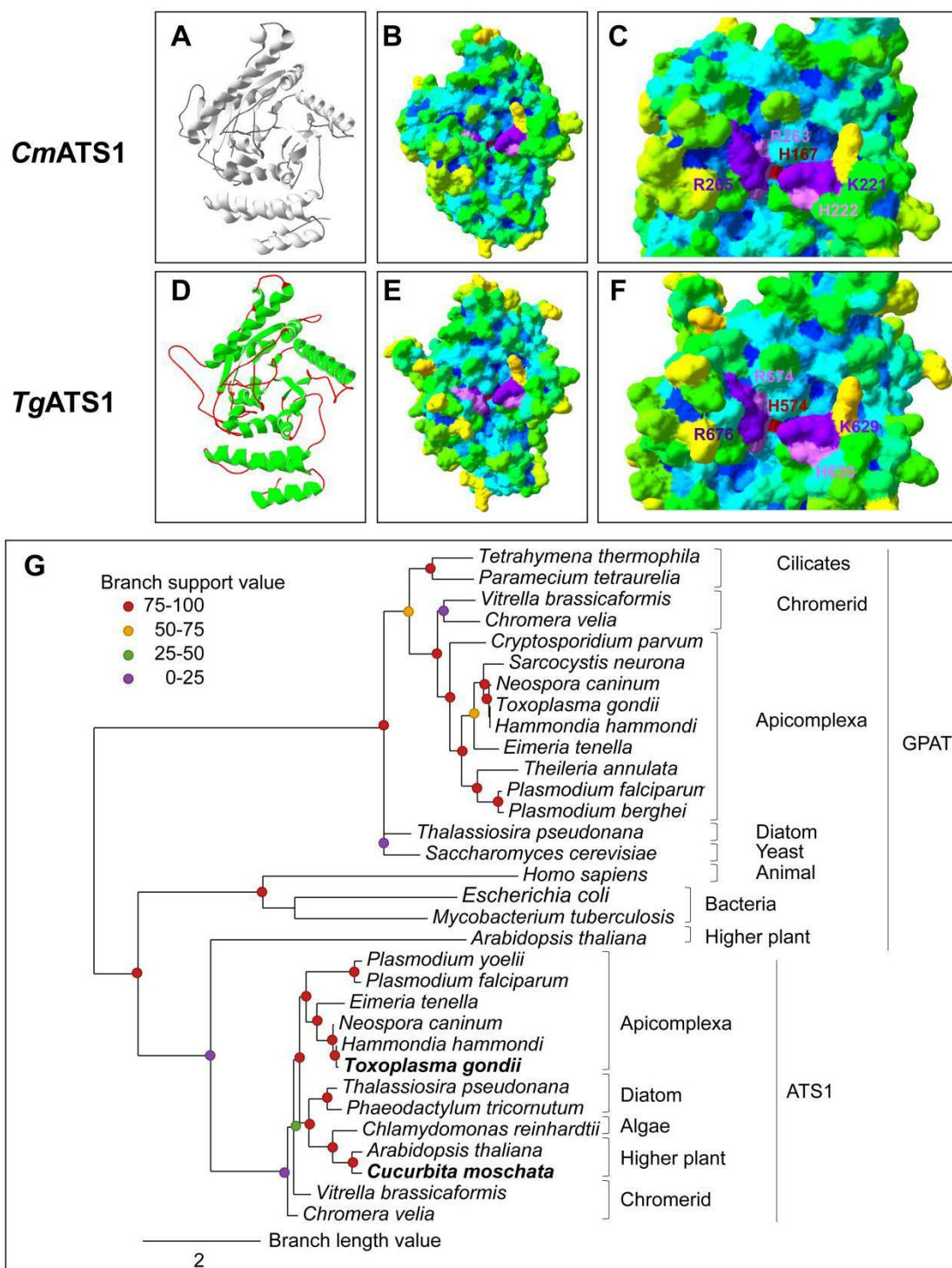


Fig. S2

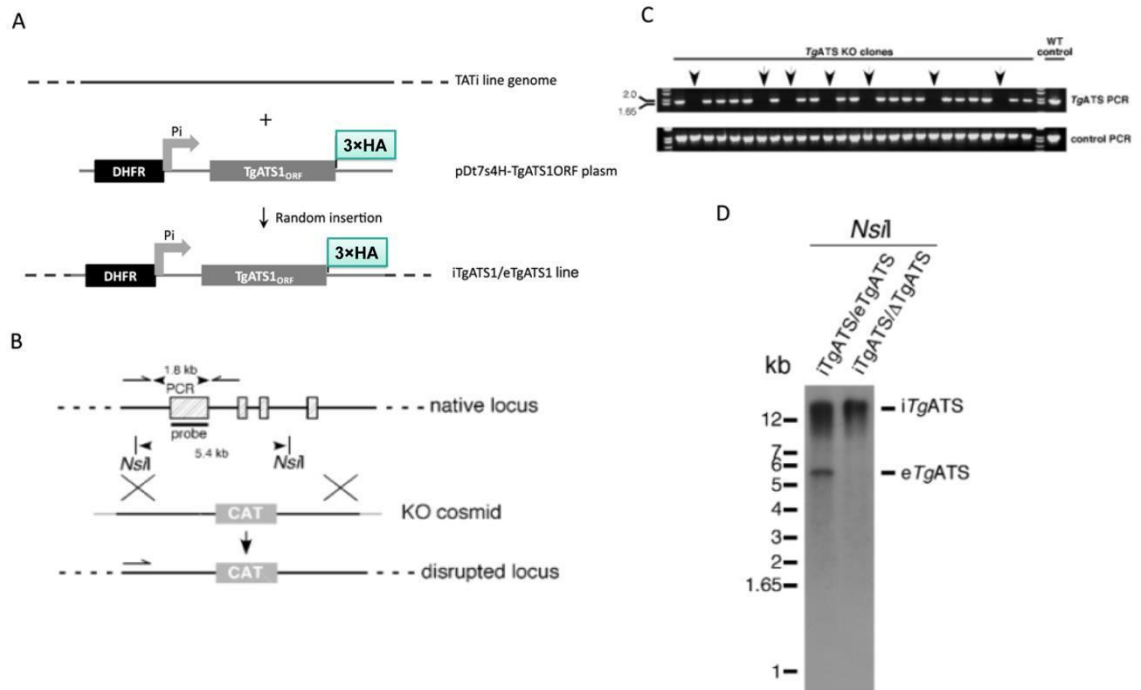


Fig. S3

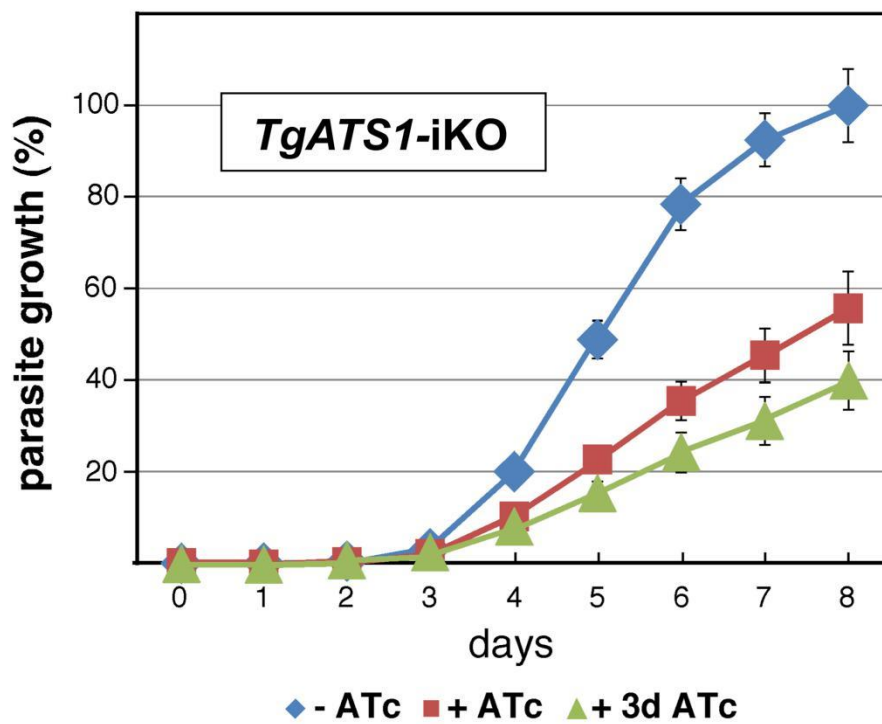


Fig. S4

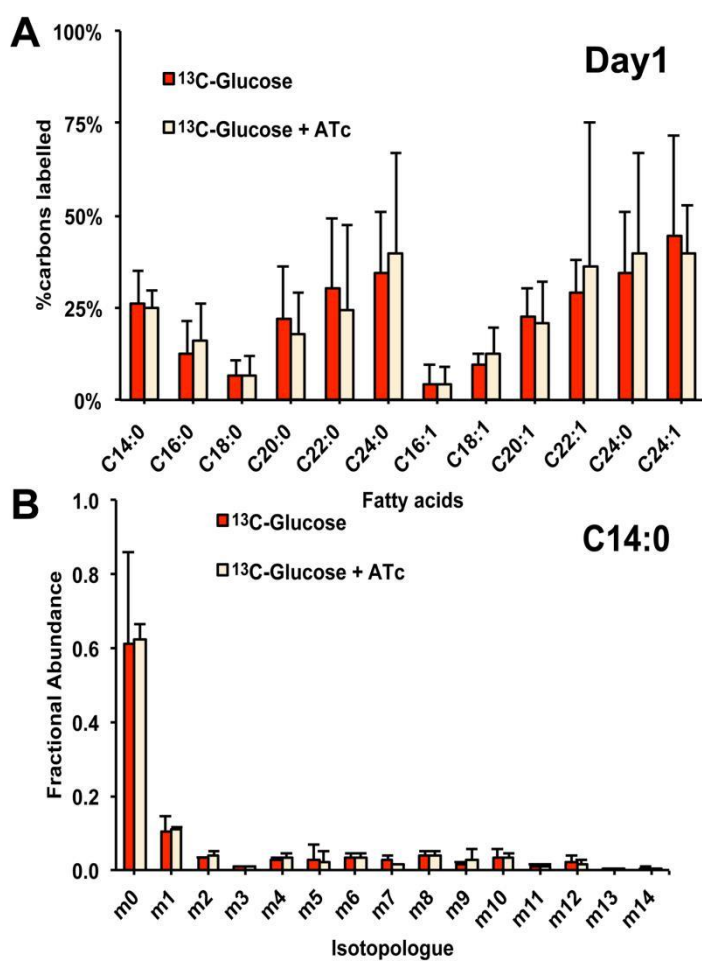


Fig. S5

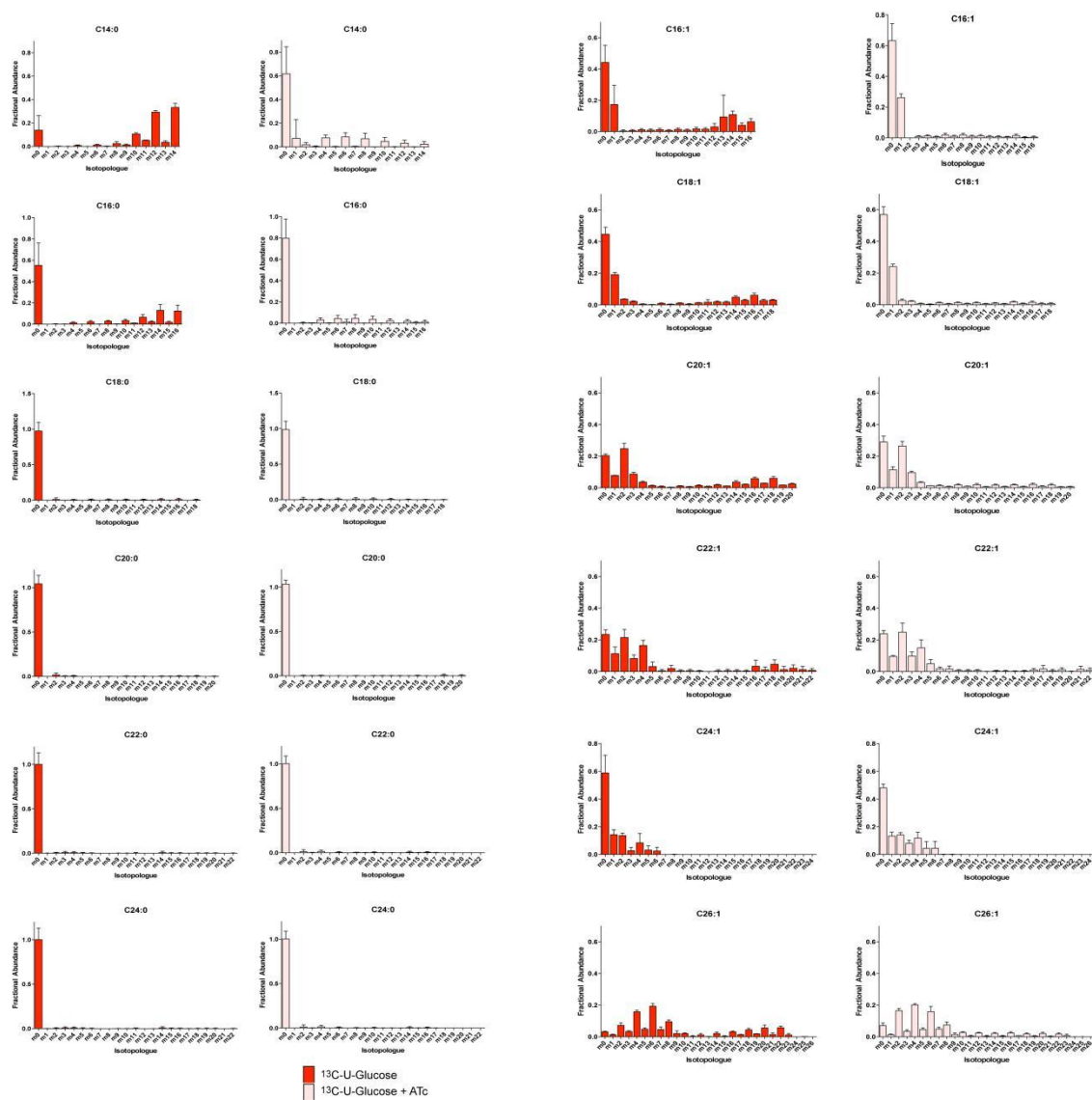


Fig. S7

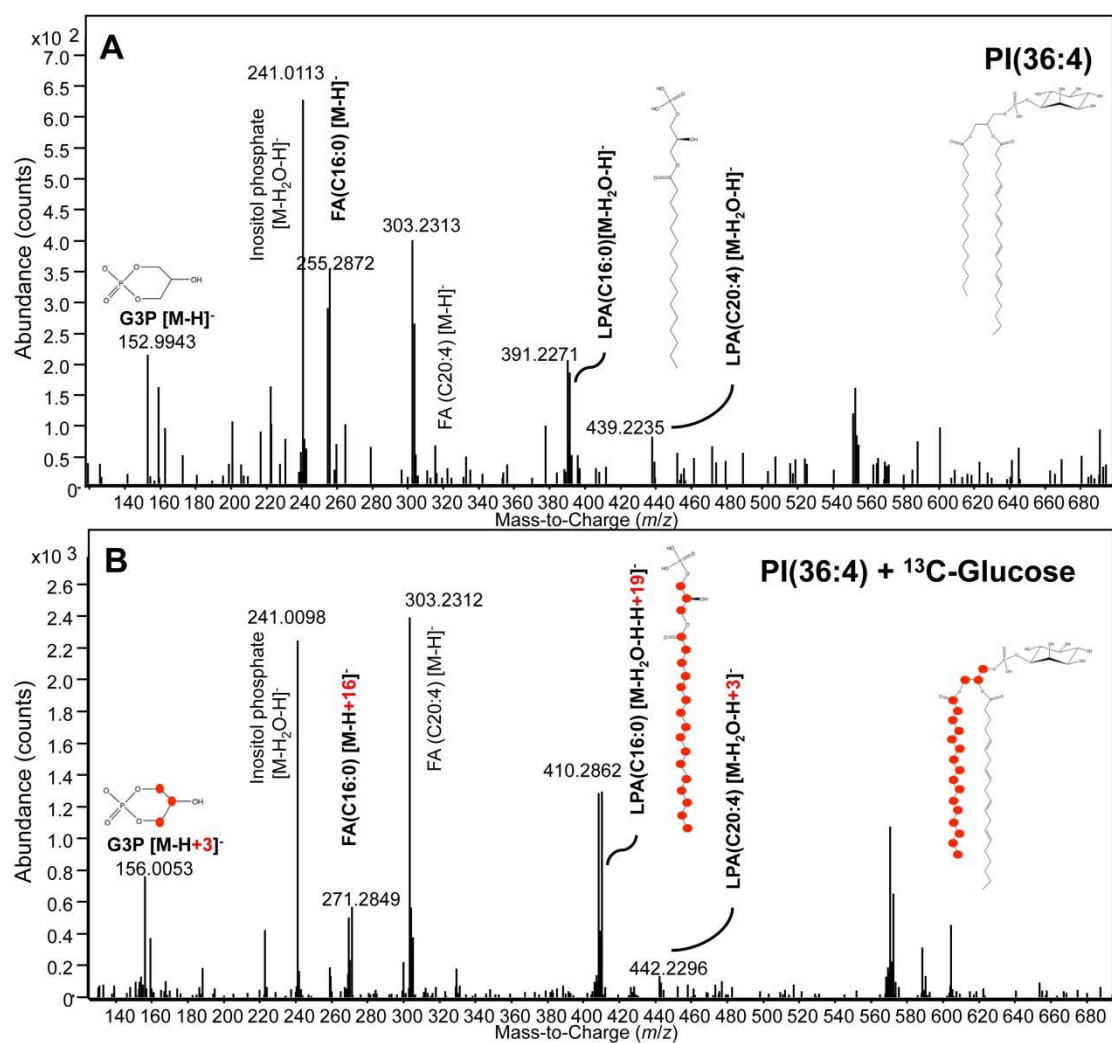


Fig. S8

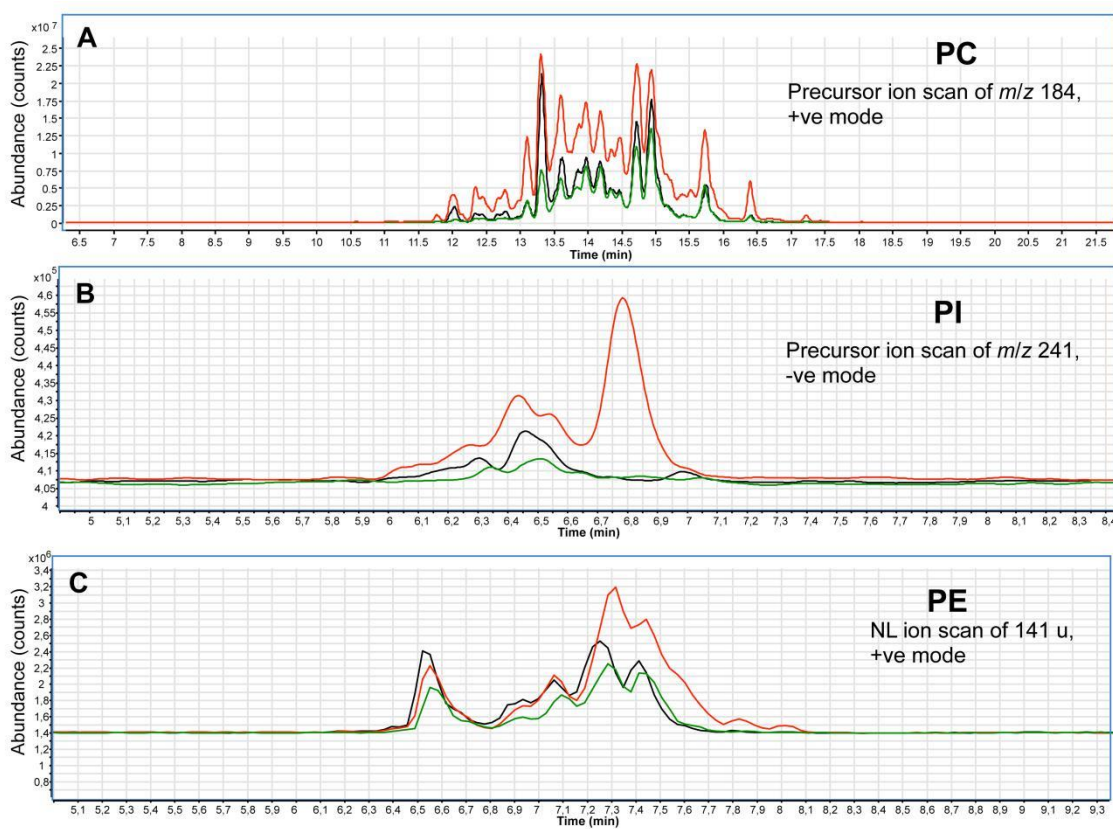


Fig. S9

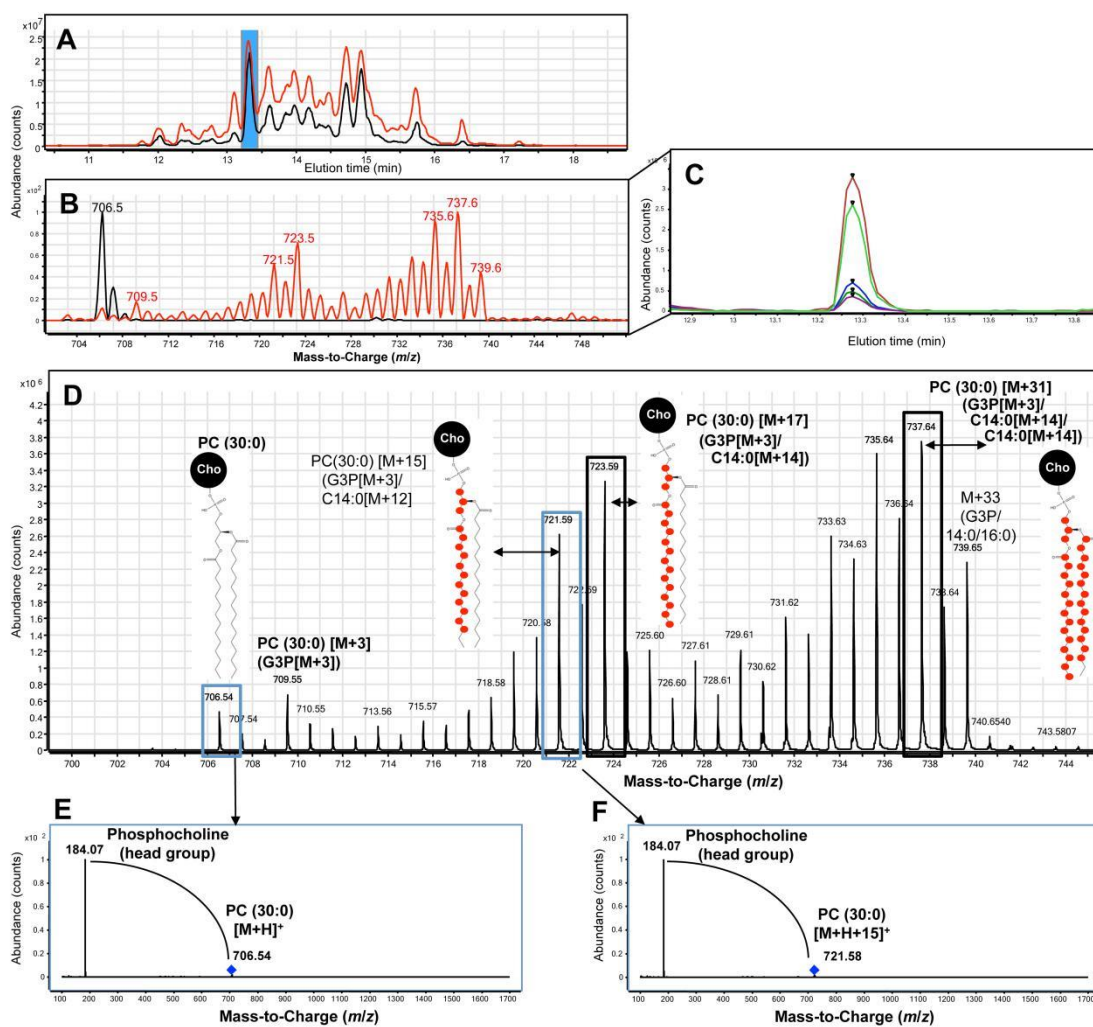


Fig. S10

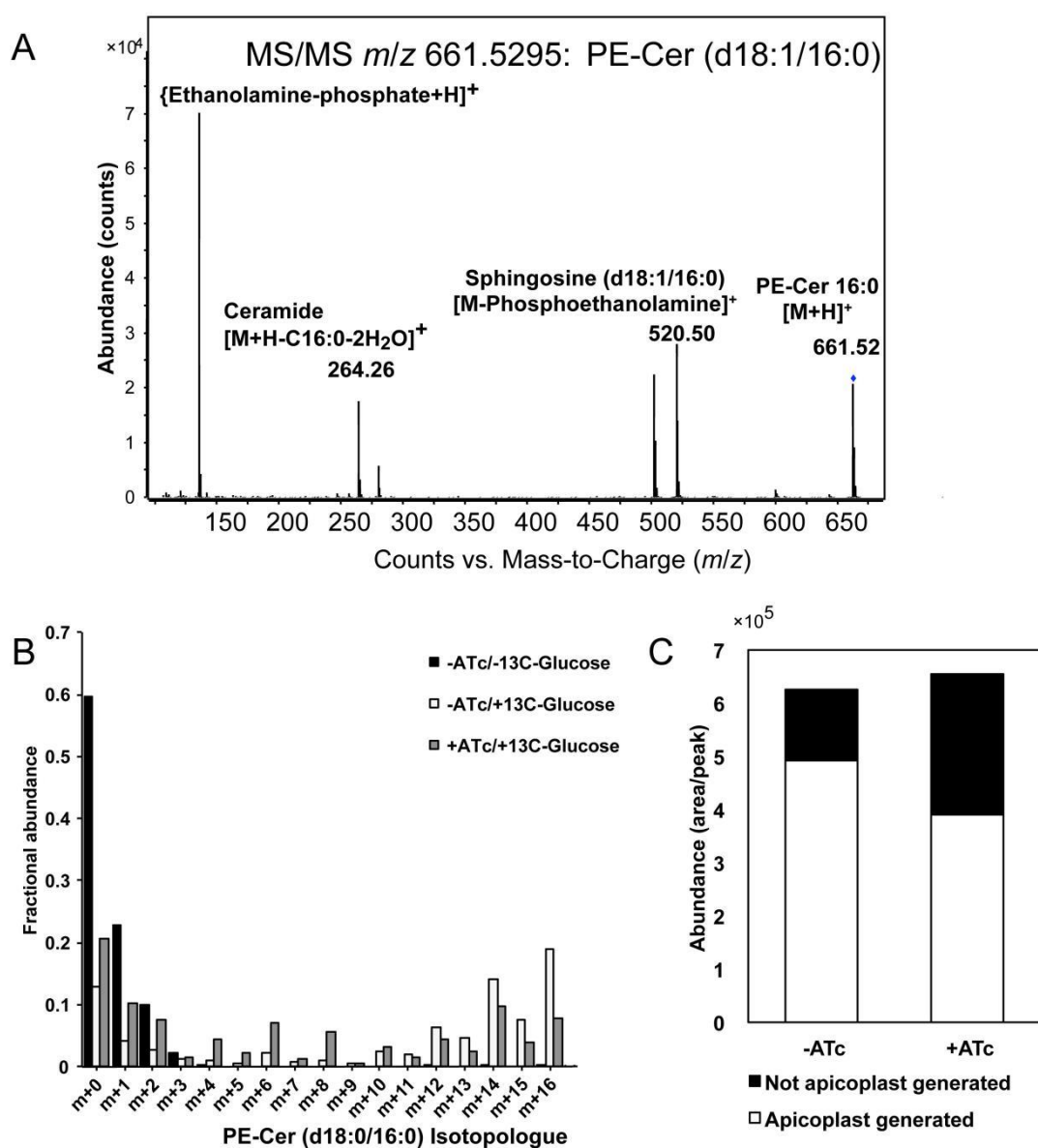
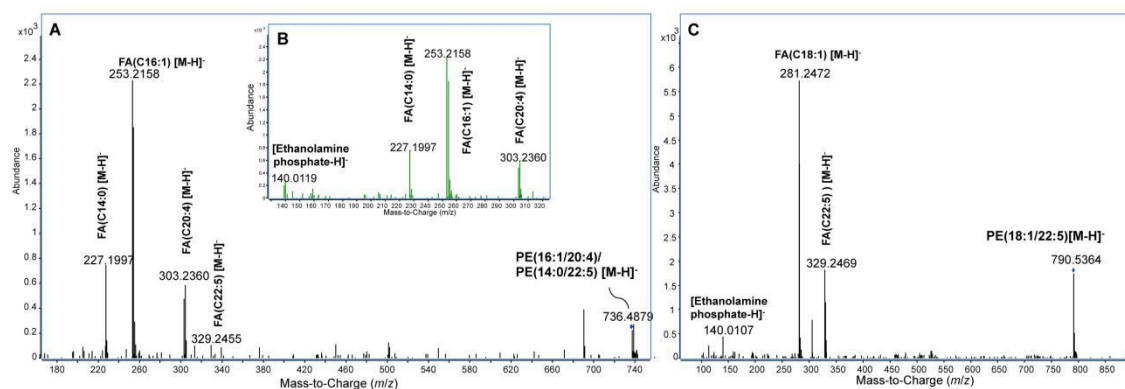


Fig. S11



III- Informations supplémentaires

Test de l'activité glycérol 3-phosphate acyltransférase de *TgATS1* chez le mutant $\Delta plsB26$ bactérien

Matériels et méthodes

Complémentation du mutant bactérien déficient $\Delta plsB26$ (BB-26) : Afin d'examiner l'activité de *TgATS1*, la protéine complète et la forme mature de *TgATS1m* ont été exprimées dans un mutant bactérien *E. coli plsB26* (BB-26) de l'activité glycérol 3-phosphate acyltransférase (Cronan *et al.*, 1974). La souche BB-26 présente une croissance très ralentie en milieu minimum. Elle est auxotrophe pour le glycérol et a un défaut d'affinité au G3P (Cronan *et al.*, 1974). La séquence codant la protéine *TgATS1* a été optimisée pour l'expression dans la bactérie et synthétisée (*TgATS1co* ; Genscript). La séquence codant la protéine mature de *TgATS1* a été amplifiée à partir de la séquence *TgATS1co* avec le set d'amorces 5'-AAGAGCTCGGTGAAAATGTTGTTTTCTGAGCA-3' et 5'-AAGCTTAAGCTTTTATTCAAAGTGTGCGGTG-3'. Les séquences nucléiques *TgATS1co* et *TgATS1mco* ont été digérées par l'enzyme de restriction *HindIII* et clonées dans le plasmide d'expression pQE30Xa-His linéarisé avec la même enzyme. La souche déficiente BB-26+pREP4 (offerte par mon homologue Melanie Shears, Melbourne, Australie) a été testée pour le défaut de croissance en milieu minimum M56LP et M56LP+glycérol. Le milieu M56LP est constitué de 0.4% glucose, 0.1% acide cosamine, 100mM Tris, 10 mM KCl, 15 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM MgCl₂, 0.3 mM phosphate (sel K⁺) à pH 7.4 ajusté avec HCl. Le milieu M56LP+glycérol contient en plus, 0.1% glycérol (Cronan *et al.*, 1974). Le plasmide pREP4 permet de réguler l'activité de l'opéron Lac porté par le plasmide pQE30Xa-His (recommandations de Qiagen). La souche BB-26+pREP4 a été rendue électro-compétente par un traitement au froid. Ensuite, ces bactéries ont été transformées par les plasmides d'expression pQE30Xa-His-*TgATS1co* et pQE30Xa-His-*TgATS1mco* obtenus à partir de clones indépendants. Le plasmide pQE30Xa-His-*EcplsB* a été utilisé comme control positif du rétablissement de la croissance du mutant BB-26 en milieu M56LP et le plasmide vide pQE30Xa comme control négatif. Les transformants ont été dans un premier temps,

cultivés dans des conditions non permissives (M56LP+glycérol) afin de permettre une croissance adéquate pour tous les isolats jusqu'à une densité optique $DO_{600nm}=4$. Les cultures ont été, dans un deuxième temps, diluées en cascade jusqu'à $DO_{600nm}=0.01$ dans du milieu M56LP. Chaque dilution est disposée en duplicata dans une plaque 96 puits (200 μ l/puit) et la croissance est analysée par un automate de lecteur des microplaques (TECAN). La DO_{600nm} est alors mesurée toutes les 30 min sur une culture de 24h.

Extraction protéique et Western-blot: Afin de confirmer l'expression de His-TgATS1co et His-TgATS1mco dans la souche BB-26, j'ai réalisé une extraction des protéines à partir d'un lysat bactérien. Les cultures bactériennes ont été incubées à 37°C dans le milieu de culture LB en agitation continue. 24 h post-inoculation, les cultures sont diluées pour une $DO_{600nm}=0.5$ et remises en culture 4h. J'ai utilisé alors un protocole optimisé au laboratoire (Hakimi lab) pour séparer la fraction soluble et la fraction insoluble. Le culot bactérien est suspendu dans un tampon de lyse (50 mM tampon de phosphate pH 7.4, 300 mM NaCl, 2 mM DTT et une pastille des inhibiteurs de protéases). Les suspensions sont incubées 30 secondes dans l'azote liquide et décongelées dans l'eau tiède. Cette opération est répétée cinq fois pour optimiser la lyse bactérienne. Ensuite, les lysats sont mélangés avec 0.1% de Nonidet P40 (NP40) et centrifugés 20 minutes à 20 000 g et à 4°C pour séparer la fraction soluble (le surnageant) et la fraction insoluble (le culot). Le culot est suspendu dans le tampon de lyse. Les extraits protéiques sont mélangés avec un tampon SDS 2x (0.09 M Tris/HCl pH 6.8, 20% glycérol, 2% SDS, 0.02% bleu de bromophénol et 0.1M DTT) et chauffés 5 minutes à 95°C pour dénaturer les protéines avant la séparation sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE. Ensuite, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (Millipore), elle-ci est bloquée avec une solution de saturation au lait et incubée avec un anticorps anti-His-HRP conjugué (Sigma aldrich). La chimioluminescence est détectée avec le substrat LuminataTM (Millipore).

Résultats et discussion

TgATS1, fonctionnellement ne complémente pas la souche bactérienne déficiente Δ plsB26. Afin de vérifier l'activité glycérol 3-phosphate acyltransférase prédite de TgATS1, j'ai testé la capacité de cette enzyme à compléter la souche bactérienne BB-26 déficiente pour cette même activité acyltransférase. La souche bactérienne BB-26 (Δ plsB26) présente un important défaut de croissance en milieu minimum sans glycérol

(Cronan *et al.*, 1974). Ainsi, la souche BB-26 a été transformée avec des plasmides d'expression codant la protéine complète *TgATS1co* et la protéine mature dépourvue du signal d'adressage à l'apicoplaste *TgATS1mco*. Les deux protéines *TgATS1co* et *TgATS1mco* sont fusionnées en région N-terminal à une étiquette histidine (6xHis). La croissance des isolats est alors testée en conditions normales et en conditions non-permissives. Un control positif de cette complémentation a été réalisé par l'utilisation d'un plasmide d'expression codant *PlsB* et un control négatif correspondant au plasmide vide. L'expression de *TgATS1co* et *TgATS1mco* a été vérifiée par Western-blot sur des fractions protéiques solubles et insolubles.

Comme indiqué dans Fig. 19a, les différents isolats bactériens utilisés pour cette analyse ont une croissance exponentielle (Fig. 19a. -1-) comparable à celle la souche BB26 dans un milieu M56LP complémenté avec 0.1% de glycérol. Ensuite, les cultures entrent en phase stationnaire après environs 7h de culture (Fig. 19a. -2-) et une phase de déclin est observée au-delà de 20h de culture (Fig. 19a. -3-). Dans le cas d'une culture en milieu minimum M56LP, la souche BB-26 présente un défaut de croissance comme attendue dû à son auxotrophie pour le glycérol (Fig. 19b). Par ailleurs, la complémentation de la souche avec l'enzyme bactérienne *PlsB* permet de restituer la croissance de la bactérie dans ce milieu (Fig. 19b). L'expression de *PlsB* dans la souche BB-26 a été confirmée par Western-blot et le signal 6xHis est détecté dans la fraction insoluble. Ce résultat est cohérent avec l'activité de *PlsB* au niveau de la membrane plasmique de la bactérie (Cronan *et al.*, 1974). Cependant, l'expression de *TgATS1co* ne permet pas d'améliorer la croissance de la BB-26 en milieu minimum (Fig. 19b). La synthèse de la protéine par la bactérie a été confirmée par Western-blot (Fig. 19c). Elle est détectée dans les deux fractions protéiques, solubles et insolubles (Fig. 19c). Cependant, la taille de la protéine détectée ne correspond pas aux tailles détectées précédemment dans *T. gondii*, 72kD pour la protéine pré-mature et 55 kD pour la forme mature (voir article ci-dessus). L'hypothèse serait alors que le signal détecté correspond à la région 6xHis-N-terminal bipartite impliquée dans l'adressage de l'enzyme vers l'apicoplaste, tronquée par la bactérie. Ceci rend l'enzyme soluble et inactive au niveau de la membrane bactérienne. Cette hypothèse pourrait expliquer en partie l'incapacité de *TgATS1co* à rétablir la croissance de la souche BB-26 en milieu minimum. Partant de ces observations, nous avons décidé d'exprimer chez la bactérie la forme mature de *TgATS1* dépourvue de son signal N-terminal d'adressage vers l'apicoplaste. La détermination du N-terminal a été

réalisée en fonction des alignements multiples avec les différentes enzymes glycérol 3-phosphate acyltransférases, de la bactérie, de *P. falciparum* (Shears *et al.*, 2016) et celle de *T. gondii*. Les protéines adressées vers l'apicoplaste de *T. gondii* ont souvent la particularité de posséder une longue région N-terminal. Nous avons alors considéré que la forme mature de la protéine correspond à la région la plus conservée entre les trois enzymes. Par ailleurs, nous a pris en considération la taille de la protéine mature détectée par Western-blot dans l'étude précédente (Amiar *et al.*, 2016) pour confirmer la prédiction de la séquence en acides aminés de la forme mature de *TgATS1mco*. Afin d'optimiser l'expression de *TgATS1mco*, nous avons amplifié la séquence codant cette protéine à partir de la séquence d'ADN optimisée et synthétisée de *TgATS1co*.

L'expression de cette protéine a été détectée dans la bactérie BB-26 principalement dans la fraction insoluble avec une très faible détection en fraction soluble (Fig. 19c). Le signal His détectée correspond à la taille attendue de la protéine *TgATS1mco* (40k D). Cependant, cette forme mature de *TgATS1mco* est aussi incapable de restaurer la croissance de la souche BB-26 en milieu M5LP (Fig. 19b). Deux hypothèses sont alors possibles : i) la protéine *TgATS1mco* n'est pas fonctionnelle dans la bactérie et serait adressée dans les corps d'inclusion, ii) *TgATS1mco* est correctement adressée vers la membrane plasmique de la bactérie mais ne serait pas active dans la bactérie. Cette deuxième hypothèse pourrait être expliquée soit par l'incapacité de *TgATS1* à reconnaître les substrats bactériens ou par l'incapacité de la bactérie d'utiliser le produit de *TgATS1*. Chez *E. coli*, *plsB* assure l'assemblage d'un acide gras C16:0-ACP ou C18:1-ACP en position *sn-1* du G3P pour former du LPA(16:0) ou LPA(18:1). Ce substrat est ensuite, utilisé par l'enzyme *plsC* pour la synthèse du PA avec l'addition d'un C16:1 ou un C18:1 en position *sn-2* (Coleman, 1990 ; Ohlrogge and Browse, 1995 ; Rock and Jackowski, 2002 ; Kim *et al.*, 2004). Dans l'article précédent, nous avons pu démontrer que *TgATS1* été principalement impliquée dans l'incorporation d'un C14:0 dans les phospholipides. Le 14:0 est très faiblement abondant dans les phospholipides majeurs constituant les membranes bactériennes: PE et PG (SIERVO, 1969 ; Lindner *et al.*, 2014 ; Roier *et al.*, 2015). Ainsi, il est possible que le produit de *TgATS1* dans la bactérie ne soit pas utilisé par la bactérie pour la synthèse des phospholipides nécessaires à la restauration de la croissance en conditions non permissives. En conclusion, cette étude a permis de constater l'incapacité de *TgATS1* à restaurer le défaut de croissance de la souche bactérienne BB-26 déficiente pour l'activité glycérol 3-phosphate acyltransférase.

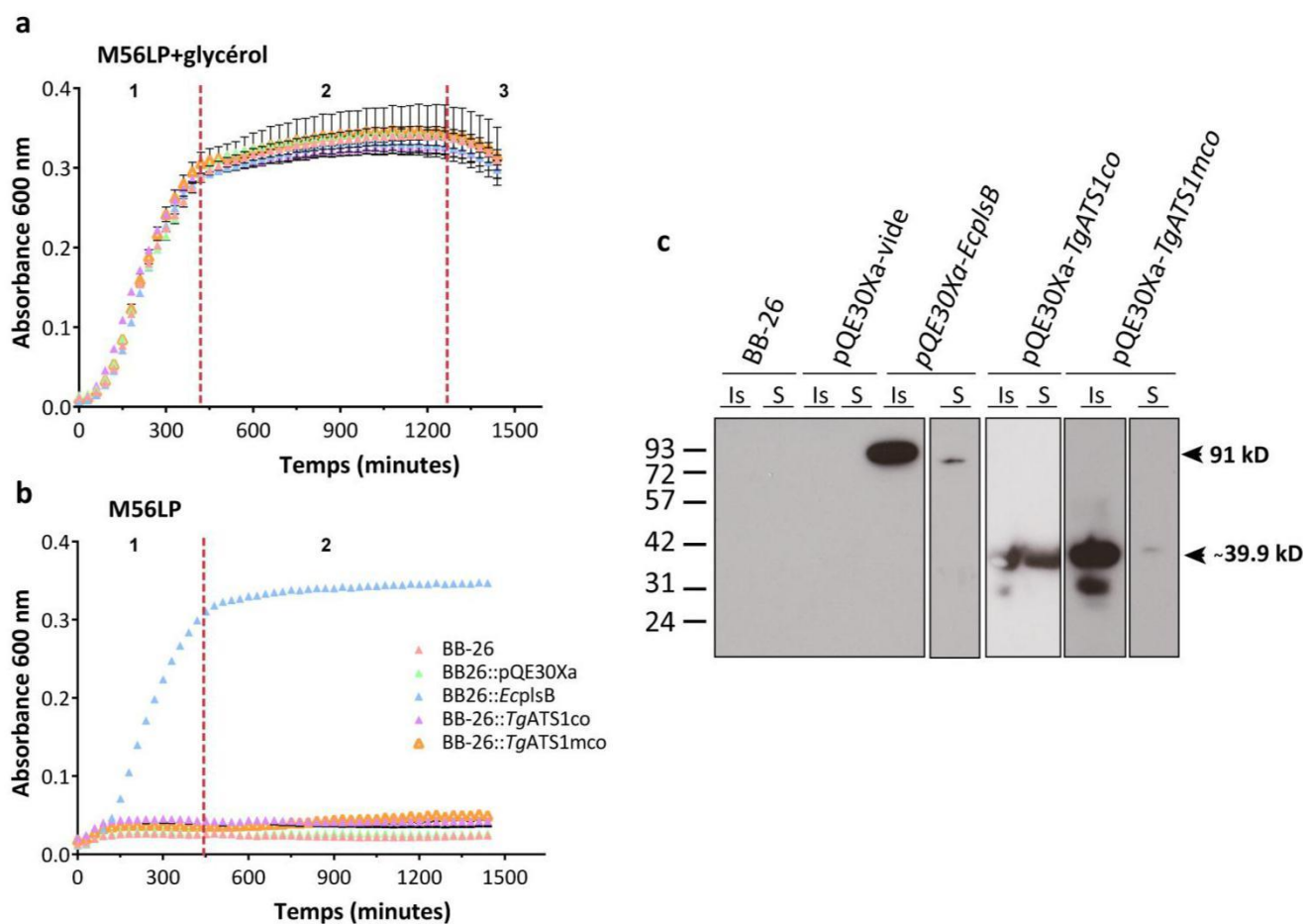


Figure 19 : *TgATS1* ne restore pas la croissance de la souche *E. coli* déficiente pour l'activité glycérol 3-phosphate acyltransférase BB-26. Test de croissance sur une culture de 24h des souches bactériennes BB-26 complémentées avec des différents plasmides d'expression: pQE30Xa vide (control négatif), pQE30Xa+*EcplsB*, pQE30Xa+*TgATS1co*, pQE30Xa+*TgAST1mco* en milieu minimum M56LP+glycérol (**a**) et en milieu minimum seul M56LP (**b**). **c**) Western-blot des fractions protéiques soluble ou insolubles extraits à partir des souches BB-26 exprimant les différentes protéines fusionnées à une étiquette His en région N-terminal. Le signal His est détecté par un anticorps anti-His-HRP. Is : fraction insoluble, S : fraction soluble.

Chapitre II :
L'acide phosphatidique et son
implication dans le développement
intracellulaire de *T. gondii*

I- Préambule

Auteurs :

Souad Amiar, Camille Brunet, Bastien Touquet, Laurence Berry, James I. MacRae, Mohamed-Ali Hakimi, Yoshiki Yamaro-Botté, Cyrille Y. Botté (in progress)

« *Apicoplast phosphatidic acid coordinates specific phospholipid synthesis and lipid dynamics with proper cell division in *Toxoplasma gondii** »

Les phospholipides sont les constituants majeurs des membranes de *Toxoplasma gondii* (Foussard *et al.*, 1991 ; Gupta *et al.*, 2005 ; Welti *et al.*, 2007). La phosphatidylcholine est le phospholipide le plus abondant suivi de la phosphatidyléthanolamine et de la phosphatidylsérine (Foussard *et al.*, 1991 ; Gupta *et al.*, 2005 ; Welti *et al.*, 2007). *T. gondii* est capable de synthétiser *de novo* ces phospholipides nécessaires à sa biogénèse membranaire (Charron and Sibley, 2002 ; Gupta *et al.*, 2005 ; Sampels *et al.*, 2012, Gupta *et al.*, 2012 ; Hartmann *et al.*, 2014). L'acide phosphatidique est le précurseur universel à la synthèse de tous les autres phospholipides. Le PA aussi a été détecté chez *T. gondii* (Gupta *et al.*, 2005 ; Welti *et al.*, 2007). Le PA est formé par deux étapes d'acylation (i.e. estérification d'un acide gras) successives du glycérol 3-phosphate en utilisant principalement les acides gras synthétisés *de novo* par la voie *FASII* l'apicoplaste. Ces acylations sont catalysées par deux acyltransférases spécifiques : une glycérol 3-phosphate acyltransférase (GPAT) et *sn*-acylglycérol 3-phosphate acyltransférase (AGPAT), formant le LPA et le PA, respectivement. Dans les cellules végétales, la synthèse du PA se fait selon deux voies distinctes dont l'une est localisée au niveau du chloroplaste et l'autre dans le réticulum endoplasmique. La voie décrite dans le chloroplaste est dite « procaryote » due à l'origine procaryotique du chloroplaste. Cette voie est de plus retrouvée aussi chez les procaryotes (Heinz, 1977 ; Kunst *et al.*, 1988 ; Coleman, 1990). Les deux enzymes acyltransférases responsables de cette synthèse et homologues à GPAT et AGPAT, sont alors nommées ATS1 et ATS2. Le PA formé dans le chloroplaste sert à la synthèse de la PG et, en partie à celle de galactolipides en utilisant exclusivement des acides gras produits par *FASII* (Kunst *et al.*, 1988 ; Ohlrogge and Browse, 1995 ; Li-Beisson *et al.*, 2010). D'autre part, la seconde voie de la synthèse du PA, voie dite « eucaryote », est localisée dans le réticulum endoplasmique de tous les organismes eucaryotes (Yamashita *et al.*, 2014).

Elle est impliquée dans la synthèse de tous les lipides. Chez *T. gondii*, la synthèse *de novo* du PA à partir des acides gras synthétisés *de novo* par le parasite reste inconnue. Dans notre précédent étude, nous avons pu démontrer la présence de la première étape de synthèse du PA *via* la voie « procaryotique » dans l'apicoplaste par l'activité de TgATS1 qui assemble exclusivement les acides gras à chaîne longue C14:0 et C16:0 de la voie *FASII* (Amiar *et al.*, 2016). Ceci suggère l'existence d'une seconde enzyme, dans l'apicoplaste ou ailleurs, qui utilise le LPA formé par TgATS1 pour l'intégrer dans la synthèse des phospholipides membranaires (PC, PE et la PI).

Dans l'étude décrite ici, j'ai identifié deux acylglycérol-3-phosphate acyltransférases, phylogénétiquement distinctes, et peut être responsables de la synthèse du PA chez *T. gondii*, respectivement localisées dans l'apicoplaste et le réticulum endoplasmique. La première acyltransférase TgATS2 est une orthologue à l'enzyme décrite dans le chloroplaste des plantes et est capable de restaurer la croissance de la souche bactérienne *E. coli* SM2-1 déficiente de l'activité AGPAT en condition non-permissive (42°C). Contrairement à TgATS1, TgATS2 n'est pas vitale pour le développement intracellulaire du tachyzoïte comme observé après génération et caractérisation d'un mutant KO stable par une approche utilisant la méthode du CRISPR-Cas9 nouvellement implémentée chez *T. gondii* et au laboratoire. Néanmoins, le mutant stable Δ TgATS2 présente un important ralentissement de la croissance intracellulaire du parasite qui est probablement dû au défaut de scission de la membrane plasmique après la cytokinèse observée lors de la division du parasite. Au niveau de la synthèse des lipides, ce phénotype se traduit par une importante réduction de l'abondance relative et l'incorporation de de l'acide gras C14:0 issu de *FASII* dans les lipides totaux du parasite. Aussi la perte de TgATS2 induit une importante accumulation du LPA et une réduction de la synthèse du PG. Cependant, l'abondance des autres phospholipides ne semble pas être affectée malgré la réduction de l'incorporation du C14:0.

II- Article (page suivante)

Apicoplast phosphatidic acid coordinates specific phospholipid synthesis and lipid dynamics with proper cell division in *Toxoplasma gondii*

Souad Amiar¹, Camille Brunet¹, Bastien Touquet², Laurence Berry³, James I. MacRae⁴, Mohamed-Ali Hakimi⁵, Yoshiki Yamaro-Botté¹, Cyrille Y. Botté^{1*} (in progress)

¹ ApicoLipid group, Institute for Advanced Biosciences UMR5309, CNRS, Université Grenoble Alpes, INSERM, Grenoble, France, ² Interactions Hôte-Pathogène & Immunité des infections, Institute for Advanced Biosciences UMR5309, CNRS, Université Grenoble Alpes, INSERM, Grenoble, France, ³ DIMNP, Montpellier, France, ⁴ The Francis Crick Institute, The Ridgeway, Mill Hill, London, United Kingdom, ⁵ Dynamiques Membranaires dans les Interactions Parasites-Hôtes, Institute for Advanced Biosciences UMR5309, CNRS, Université Grenoble Alpes, INSERM, Grenoble, France

Abstract

Toxoplasma gondii is an important protozoan parasite belonging to the Apicomplexa phylum. *T. gondii* is responsible for toxoplasmosis that can occur in a wide of vertebrates and is present in one third of the global human population. During the acute phase of the disease, *T. gondii* tachyzoite has a fast replicative division cycle within its host cell. This intracellular replication requires an important amount of phospholipids to build the organelle membranes and daughter cell membranes, to ensure the extension of parasitophorous vacuoles and thus allow parasite division and survival. In this work, we identified a phosphatidic acid (PA) synthesis pathway in the apicoplast of *T. gondii* that is catalysed by a homolog of the chloroplast acyltransferase enzyme, named *TgATS2*. *TgATS2* CrispR-Cas9 disruption in *T. gondii*, significantly affects the parasite intracellular growth and alters the cell division and parasite cytokinesis. Stable isotope labelling and lipidomic analysis on the $\Delta TgATS2$ mutant, show a sharp decrease in the presence of C14:0 in most phospholipid class and a significant reduction of phosphatidylglycerol. Our analysis reveals that, unlike *TgATS1* responsible for bulk phospholipid synthesis, *TgATS2* is responsible for the synthesis of a specific precursor coordinating the correct division of the parasite.

Introduction

Apicomplexa phylum includes a wide range of protozoan organisms, which are obligate intracellular parasites responsible for serious diseases in human and livestock, including malaria, toxoplasmosis, cryptosporidiosis, and coccidiosis. Various members of the Apicomplexa have acquired a vestigial non photosynthetic plastid by a secondary endosymbiosis of red algae [McFadden *et al.*, 1996; Köhler *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1996; Wilson and Williamson, 1997; Janouskovec *et al.*, 2010]. This plastid, named the apicoplast, contains its own 35-kb circular genome that has been sequenced in both *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* [Wilson *et al.*, 1996; Köhler *et al.*, 1997]. Furthermore and except the loss of photosynthetic capacity, the apicoplast harbours most of the metabolic pathways identified in plant and algal plastids including a prokaryotic type II fatty acid synthesis pathway (*FASII*) [Waller *et al.*, 1998; Waller *et al.*, 2000]. The apicoplast is essential for parasite intracellular development and survival [Fichera and Roos, 1997; McConkey *et al.*, 1997; He *et al.*, 2001], but not all the critical functions of the organelle are known and/or identified.

FASII differs in many aspects from mammalian *FASI* and could thus be considered as an attractive anti-parasitic drug target. In *Plasmodium spp.* *FASII* knockout mutants, parasite replication is not affected during *in vitro* asexual blood stages in both human and rodent malaria [Yu *et al.*, 2008; Vaughan *et al.*, 2009]. In contrast, during liver stage, *P. yoelii* and *P. berghei* showed an important growth defect while the late liver stage development during schizogony and merozoite maturation are abolished [Yu *et al.*, 2008; Vaughan *et al.*, 2009]. In *P. falciparum*, *FASII* requirement was recently reported during sporozoite schizogony in mosquito [Schaijk *et al.*, 2014]. In *T. gondii*, *FASII* is also essential during the intracellular development in tachyzoites whereas the pathway is completely inactive in extracellular parasite [McLeod *et al.*, 2001; Mazumdar *et al.*, 2006; MacRae *et al.*, 2012; Martins-Duarte *et al.*, 2016]. Taken together, these data suggest that *FASII* products are mainly involved during massive intracellular division of apicomplexan parasites. In fact, the rapid intracellular replication of the parasite, including organelle biogenesis, and the continuous expansion of the parasitophorous vacuole require a large amount of lipids for the massive membrane biogenesis that occur during these stages. In apicomplexan

parasites, membranes are mainly constituted with phospholipids, which represent up to 80 % of the total lipid composition [Fousard *et al.*, 2001; Vial *et al.*, 2003; Welte *et al.*, 2007; Botté *et al.*, 2013]. The major phospholipid classes characterized in the parasite membranes are phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI) [Fousard *et al.*, 2001; Vial *et al.*, 2003; Gupta, 2005; Welte *et al.*, 2007; Botté *et al.*, 2013]. *T. gondii* is able for the *de novo* synthesis of these phospholipid classes, despite its ability to scavenge them from the host cell [Séron *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2012; Ramakrishnan *et al.*, 2013; Sampels *et al.*, 2012; MacRae *et al.*, 2014; Hartmann *et al.*, 2014; Amiar *et al.*, 2016]. Furthermore, *de novo* phospholipid synthesis is always initiated by the assembly of fatty acids into a central precursor: phosphatidic acid (PA). Fatty acids integrated into phospholipids may derived from *FASII*, from *FASII*-elongated fatty acids in ER (FAE) or scavenged from host cell [Charron and Sibley, 2002; Bisanz *et al.*, 2006; Ramakrishnan *et al.*, 2013; Ramakrishnan *et al.*, 2015; Amiar *et al.*, 2016]. Our previous work identified the first step of PA synthesis, i.e. the generation of lysophosphatidic acid (LPA) that occurs in the apicoplast of *T. gondii* [Amiar *et al.*, 2016]. This pathway was also identified in the apicoplast of *P. falciparum*, *P. berghei* and *P. yoelii* [Lindner *et al.*, 2014; Shears *et al.*, 2016]. LPA is formed by the acylation of glycerol 3-phosphate *via* a glycerol 3-phosphate acyltransferase. In *T. gondii*, LPA synthesis in the apicoplast is catalysed by a plant/algal-like enzyme named *TgATS1*, homolog of the chloroplast glycerol 3-phosphate acyltransferase [Amiar *et al.*, 2016]. We showed that synthesis of specific LPA species in the apicoplast is essential for intracellular organelle biogenesis, including the inner membrane complex and the apicoplast that leads to parasite death [Amiar *et al.*, 2016]. LPA is synthesized in the apicoplast and mainly, contains C14:0 made *via* the *FASII*. This LPA(14:0) is then used a precursor for the bulk phospholipid synthesis of PC, PI and PE [Amiar *et al.*, 2016].

LPA is usually converted into PA *via* the activity of a *sn*-acylglycerol 3-phosphate acyltransferase (AGPAT) that catalyses the esterification of a fatty acid residue (acyl-CoA/ACP) onto the free *sn*2-position of the glycerol residue from LPA, thus forming PA. In plant and algae, there are two PA synthesis pathways, one located in chloroplast and the other in the ER [Ohlrogge and Browse, 1995]. PA synthesis in chloroplast has

been named the “prokaryotic-pathway” due to the cyanobacterial origin of the plastid. This prokaryotic pathway specifically generates PA, *via* the acyltransferases respectively named ATS1 and ATS2. The PA synthesized *via* the prokaryotic pathway is used as a precursor for the downstream synthesis of a single phospholipid (PL) class: phosphatidylglycerol (PG) along with galactolipids [Kunst *et al.*, 1988]. The other PA synthesis pathway is called the “eukaryotic pathway”, which is also found in all animal cells. Both acyltransferases from the eukaryotic pathway, GPAT and AGPAT, are located in the ER. The eukaryotic PA is then used as a precursor for the synthesis of PC and galactolipids in close association with the chloroplast [Ohlrogge and Browse, 1995; Awai *et al.*, 2006; Li-Beisson *et al.*, 2010; Kelly *et al.*, 2016]. Given our previous study on the LPA synthesis pathway in apicoplast, we hypothesized that this plant-like organelle should also contain the second prokaryotic-like acyltransferase of the PA synthesis pathway

In this work we identified two phylogenetically distinct *sn*-acylglycerol 3-phosphate acyltransferases, putatively responsible for PA synthesis. The first enzyme is closely related to plastid-like ATS2, (thus named *TgATS2*) and localizes in the apicoplast. The other enzyme is more related to eukaryotic-like AGPATs, and localizes in the parasite ER. We generated several stable CrispR-Cas9 mutants of *TgATS2*. We show that

TgATS2 is not vital for parasite but induces a moderate growth defect and a marked phenotype in the correct daughter cell division during intracellular tachyzoite division.

¹³C-glucose metabolic labelling combined to mass spectrometry-based lipidomic analyses show that the synthesis and abundance of C14:0 from the apicoplast *FASII* is significantly reduced upon *TgATS2* disruption. Furthermore, *TgATS2* disruption results in the significant reduction of phospholipid classes, whose molecular species specifically contain C14:0. In the other hand the overall abundance of most phospholipid classes is not affected upon the loss of *TgATS2*, except for phosphatidylglycerol (PG) that is significantly reduced. Interestingly, we could not manipulate or modify the *TgAGPAT* locus nor for tagging neither for promoter replacement. However, the transient phenotype observation of the double CrispR-Cas9 KO mutants of both *TgATS2* and *TgAGPAT* depicted the specific loss of the apicoplast, only in these conditions. Our work reveals that *TgATS2* is not involved in bulk

phospholipid synthesis but rather in the specific incorporation of apicoplast C14:0 into phospholipid species, likely to coordinate the proper daughter cell division of the parasite. Together, these suggest that there are differential fluxes of PA/LPA precursors made in the apicoplast that are exported towards the ER for specific functions in membrane biogenesis and proper intracellular development.

Materials and Methods

Host cell and *T. gondii* culture

T. gondii parental lines RH TATi1- $\Delta Ku80$ [Sheiner *et al.*, 2011] and RH- $\Delta Ku80$ (a kind gift from Hakimi Lab, Grenoble, France) and derived transgenic cell lines were grown in confluent human foreskin fibroblasts (HFFs) maintained in ED1 medium that contains Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM, Life Technologies) supplemented with 5% foetal bovine serum (Life Technologies), 2 mM glutamine and 50 units/ml of penicillin and 50 μ g/ml streptomycin at 37°C and 5% CO₂.

Gene identification and sequence analysis

Arabidopsis thaliana sequence of ATS2 (GenBankTM and TAIRTM IDs: NP_194787 and AT4G30580 respectively) was used as query sequences for BLAST searches against the *Toxoplasma gondii* genome on ToxoDB database (www.toxodb.org). Phylogenetic analysis of AGPAT related proteins was performed on the Phylogeny.fr platform [Dereeper *et al.*, 2008] using proteins described in table1. Protein sequences were then aligned by ClustalW software [Larkin *et al.*, 2007] and the maximum likelihood phylogeny was generated using the PhyML [Guindon *et al.*, 2010]. We generated multiple sequence alignment using Clustal Omega [Li *et al.*, 2015].

Toxoplasma gondii plasmid constructs

Plasmid LIC-3HA-DHFR was used to generate a 3' endogenous tagging with 3xHA coding sequence of TGME49_297640 (*TgATS2*) and TGME49_240860 (*TgAGPAT*). A 2229 bp fragment corresponding to the 3' of *TgATS2* was amplified from genomic DNA using primer sets 5'-TCCTCCACTTCCAATTTTAGCGTTCGTCTCGGTGGCGGC-3' and 5'-TACTTCCAATCCAATGCTTCAGACACTCGGTGCAAA-3. A 5466 bp fragment corresponding to promoter and gene sequence of *TgAGPAT* was amplified using primer sets 5'-

TACTTCCAATCCAATGCAGCCAGCAAAGGACGAAAGG-3' and 5'-TCCTCCAATTCCAATTTTAGCGAGACCGTGGCCTCGGTGGG-3'. These fragments were cloned into pLIC-3HA-DHFR vector as described previously [Huynh and Carruthers 2009]. Vectors LIC-*TgATS2*-3HA-DHFR and LIC-*TgAGPAT*-3HA-DHFR were confirmed by PCR screen using primer sets 5'-GCATAATCGGGCACATCATA-3' and 5'-ATACGCATAATCGGGCACATCATA-3' and by sequencing (GATC BiotechTM).

Plasmid pTOXO_Cas9-CRISPR (a kind gift from Hakimi Lab, Grenoble, France) was used to integrate a gRNA within *BsaI* restriction site. Briefly, Crisp-Fwd and Crisp-Rv primer sets were phosphorylated and annealed: *TgATS2-KI*: 5'-AAGTTACGGGTGTGCGCCGCTTGCG-3' and 5'-AAAACGCAAGGCGGCGCACACCCGTA-3', *TgATS2-KO*: 5'-AAGTTGGAGCGCCGACGGGCGACTGG-3' and 5'-AAAACCAGTCGCCGTCGGCGCTCCA-3', *TgAGPAT-KO*: 5'-AAGTTGGCAGCTGGCAAGAAATCAAG-3' and 5'-AAAACCTTGATTTCTTGCCAGCTGCCA-3'. The gRNAs were then ligated into pTOXO_Cas9-CRISPR plasmid linearized with *BsaI*, yielding pTOXO_Cas9-CRISPR::g*TgATS2-KI*, pTOXO_Cas9-CRISPR::g*TgATS2-KO* and pTOXO_Cas9-CRISPR::g*TgAGPAT-KO*, respectively.

Toxoplasma gondii transfection

RH- Δ *Ku80* parasite line was transfected with 100 ng of pLIC-*TgATS2*-3HA-DHFR linearized with *BspI* for stable integration of HA-tag at C-terminus of *TgATS2*. 150 ng pTOXO_Cas9-CRISPR::g*TgATS2-KO* and pTOXO_Cas9-CRISPR::g*TgAGPAT-KO* were transfected in *TgATS2*-HA line with 10 μ g of an appropriate HXGPRT cassette amplified by PCR from pMini (Hakimi lab gift) using those primer sets, *TgATS2-KI*: 5'-

GAGGCCCTGCGTCTCCTCAAGCGAAAGGCGCCGACAGTCGACGGGTGTGCGCCGCTCAG CACGAAACCTTGCAATCAAACC-3' and 5'-GCTACTCCTTCTCCCTCTCGCGTTGTGTGTCTCCCCGTCGCGTTCTGCGTCGCCAGCAGTGTC ACTGTAGCCTGCCAGAACA-3'; *TgATS2-KO*: 5'-GACACACAACGCGAGAGGGGAAGAAGGAGTAGCTCTCGTCGCCTTCCAGAAGGTACTCCAG CACGAAACCTTGCAATCAAACC -3' and 5'-CTTCGCTGCTCGTTCGTTTCATGTGGGGAAGGAGCAGCACGAAACCTTGCAATCAAACC-3'.

Electroporations were performed in a 2-mm cuvette in a BTX ECM 630 (Harvard Apparatus, at 1,100 V, 25 Ω , and 25 μ F. Stable lines expressing the tagged constructs

were selected selected in media with 1 μ M pyrimethamine or 25 μ g/ml mycophenolic acid and 50 μ g/ml xanthine and cloned by limiting dilution.

RH- Δ Ku80 parasites were also transiently transfected with pLIC-TgAGPAT-3HA-DHFR. pTOXO_Cas9-CRISPR::gTgAGPAT-KO was transfected in RH- Δ Ku80 parasites for a simple mutant Δ TgAGPAT and in Δ TgATS2 parasites to obtain a double mutant

Δ TgATS2/ Δ TgAGPAT. The plasmid pMORN1-CherryRFP-MORN1/SagCAT (a kind Gubbels lab gift, Boston, USA) were transfected in both RH- Δ Ku80 and Δ TgATS2 parasite lines. All transfections were performed with 150 ng of DNA and electroporation conditions were as described above. Transfected parasites were incubated at different concentration with HFF cell 48 h prior to immunofluorescence assay.

Immunofluorescence assay and Microscopy

For intracellular parasite observations, parasites were infected HFF cells grown on the coverslip. Then the infected cells were incubated 20 min at 37°C with Hoechst at 5 μ g/ml in ED1 culture medium. The infected cells were fixed and permeablized with 4% paraformaldehyde and 0.5% TritonX-100 in PBS for 15 min. After blocking, monoclonal mouse anti-HA antibody (InvivoGen) was used at a dilution of 1:1000, rabbit anti-ACP at 1:2000, rabbit anti-TOM40 at 1:3000, polyclonal rabbit anti-IMC1 and anti-MIC4 antibodies (a kind gift from Soldati Lab, Geneva Switzerland) at 1:1000, rabbit anti-Sumo21 (a kind gift from Hakimi Lab, Grenoble, France) at 1:500 and mouse anti-Sag1 (a kind gift from Corinne Mercier, Grenoble, France) at 1:500. Secondary anti-mouse Alexa488-, anti-mouse Alexa546 and anti-rabbit Alexa546-conjugated antibodies (Life Technologies) were used at 1:10000 dilutions. Cells were observed using 63 x objective and fluorescent images were acquired with a fluorescence microscope (Axio Imager 2_apotome; ZEISS).

For Extracellular parasite observations, 10^7 freshly egressed parasites were fixed in 7.4% paraformaldehyde (1v:1v) for 15 min at room temperature. The parasites were centrifuged for 10 min at 900 g and pellet was washed three times with PBS to completely remove fixation solution. IFA was then performed using mouse anti-Sag1 antibody. Secondary anti-mouse Alexa Fluor488 was used at 1:10000 dilutions and cells were observed using 63X.

Growth assays

- *Plaque Assay*: HFF monolayers were infected with 500 parasites and allowed to develop under normal culture conditions for 10 days before staining with Crystal Violet (Sigma) and cell growth assessment by light microscopy for the presence of intact HFF.

- *Cell-based assay*: *T. gondii* growth was determined with an automatic microscope-based screening (Olympus ScanR, Germany). HFFs were seeded at a density of 10,000 cells per well into 96-well plates and were allowed to grow and equilibrate for 48 h at 37°C. Cells were then infected with 4×10^4 parasites/well. Invasion was synchronized by briefly centrifugation of plate at 250 *g* and placed at 37°C for 2 h. Then, infected cells were washed three times with PBS. The assay was run for 30 h. Hoechst 33342 (Life technologies) stain was then loaded on live cells/parasites at 5 µg/ml for 20 min to detect parasite nucleus. The infected cells were washed three times with pre-warm PBS and fixed with pre-warmed formaldehyde at 3.7% for 10 min at 37°C. A mouse anti-GRA1/Alexa488 labeling (dilution 1:500) was used to identify parasitophorous vacuoles. A total of 20 fields per well were taken using the 20X objective. Images were collected for the distinct fluorescence channels (Hoechst 33342: eg. 360-370 nm, em. 420-460 nm and Alexa488: ex. 460-495, em. 510-550 nm). Images were then analyzed using the ScanR analysis software (Olympus, Heidelberg, Germany). For Alexa488 channels images (vacuoles) an intensity algorithm module was used where a fixe threshold was defined with a minimum of 100 pixels size in order to segment the smallest vacuoles (one or two parasite). For Hoechst channel images (parasites nuclei), image process consists to apply a strong background correction and detected parasites with an edge algorithm. A minimum object size of 5 pixels and a maximum object 20 pixel larger one was chosen to discriminate each parasite. ScanR analysis module interface as in flow cytometry allow us to extract and display data as scatter plots and histograms. Using a “gating” procedure we were able to hierarchically filter selected data points with precise boundaries (e.g. number of vacuoles vs number of parasite/vacuoles). The proliferative index was evaluated by parasite/vacuole number ratio.

Western-Blotting

Protein expression was analysed by Western-blot using RIPA buffer on fresh egressed parasites (Sigma Aldrich). Equal amount (50 µg) of proteins were boiled in SDS-PAGE buffer separated on a 4–12% gradient SDS-polyacrylamide (Life Technologies) and transferred to PVDF membrane (Millipore). The membrane was blocked with skim milk and then probed with monoclonal mouse anti-HA antibodies (InvivoGen) at 1:2000 and mouse anti-Gra1 antibodies (a kind gift from Corinne Mercier, Grenble, France) at 1:3000. Secondary anti-mouse alkaline phosphatase antibodies (Thermo Scientific) were used at 1:20000. Signal was detected after membrane staining with NB-BCIP (Thermo Scientific).

Activity analysis in LPAAT-deficient *E. coli* strains

Escherichia coli strain that is deficient in LPAAT activity [MS2-1 $\Delta pIsC$, Coli Genetic Stock Center #7587, Yale University, New Haven, CT] [Coleman, 1990] was used to confirm LPAAT activity in both *TgATS2* and *TgAGPAT*. Coding sequence of *TgATS2* was synthesized (Genscript). *TgAGPAT* coding sequence was amplified by RT-PCR using primer sets 5'-ATGGCGTCCACGCCGCTGC-3'/5'-TTAGAGACCGTGGCCTCGGTG-3' and *TgAGPAT* ΔN -*ter1-72* coding was amplified by RT-PCR using primer sets 5'-CTCAACCGCCCGCCAGGAATTA-3'/5'-TTAGAGACCGTGGCCTCGGTG-3'. These sequences were digested and ligated into *HindIII* restriction site on pQE30Xa vector (Quiagen) to generate expression vectors. Additionally, gene coding for *E. coli* LPAAT activity *pIsC*, was amplified from *E. coli* DH5alpha genomic DNA using primer sets 5'-CTATATATCTTTTCTTATTATTAC-3'/ 5'-AACTTTTCCGGCGGCTTC-3' and ligated into pQE30Xa vector. Then these acyltransferase vectors and empty pQE30Xa vector as negative control were transfected to eletrocompletent cells of MS2-1 $\Delta pIsC$ deficient *E. coli*. pREP4 repressor vector to regulate Lac promotor activity. Transformed bacterial populations were grown at 37°C in order to promote growth of all isolates. Two independent clones of each bacterial strain that harbours each plasmid-of-interest were isolated for this study. Rescue of LPAAT activity in SM2-1 $\Delta pIsC$ mutant was measured by the ability to grow at elevated temperature, 42°C, non-permissive temperature in LB medium as previously described [Coleman, 1990]. Bacteria were first grown in LB media at 37°C to stationary phase, then the cultures were diluted to

OD₆₀₀=0.04 and finally inoculated with several dilutions (at 10⁻¹ to 10⁻⁶) on LB plates and incubated for 24 h at permissive (30°C) and non-permissive (42°C) temperatures. All experiments were conducted in triplicate with both independent clones.

Transmission electron microscopy

HFF were cultured in Labteck chambers (Thermo Scientific) at 4 x 10³ cell/cm² in standard condition culture. Confluent cells were then infected with 10⁵ of freshly egressed parasites/chamber for 2 h and infected cells were washed three times with pre-warmed ED1 medium to remove extracellular parasites. 24 h later, parasite-infected cells were fixed in 2.5% cacodylate buffer 0.1 M pH7.4 (Electron Microscopy Sciences) and 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences) and sterilized water (Sigma Aldrich) for four hours at room temperature, washed with cacodylate buffer and postfixed 1 hour in 1% osmium tetroxide in the same buffer, followed by 2 h in 2% uranyl acetate in water. Dehydration was performed through ethanol series and samples were impregnated in epon 118: ethanol 50:50, followed by 100% epon. Polymerization was performed at 60°C for 48h. 70 nM ultrathin sections were cut with a Leica ultracut (Leica microsystems), counterstained with uranyl acetate and lead citrate and observed in a Jeol 1200 EXII transmission electron microscope. All chemicals were from Electron Microscopy Sciences (USA), solvents were from sigma.

Stable isotope labelling of *T. gondii*

Stable isotope labelling using U-¹³C-glucose (Cambridge Isotope Laboratories, USA), lipid extraction, and GC-MS analysis was performed as previously described [Ramakrishnan *et al.*, 2012; Amiar *et al.*, 2016]. Freshly infected HFF were incubated in glucose-free medium supplemented with 8 mM U-¹³C-glucose. For FBS starvation study, 5% FBS was add to U-¹³C-glucose medium in standard culture conditions and 1% FBS was add to U-¹³C-glucose medium in starvation culture condition. In both media, the other supplements (glutamine, penicillin and streptomycin) were added as described above. Parasites were harvested 72 h post-infection and metabolites extracted as above.

Lipid extraction from *T. gondii* tachyzoites

- *For total lipids analysis:* Lipid extraction and analysis of tachyzoites was performed as previously described [Ramakrishnan *et al.*, 2012]. Freshly egressed tachyzoites (10^8 cell equivalents) grown in standard culture or in starvation culture, were quenched by rapid chilling of the cell suspension in a dry ice/ethanol bath and lipids were extracted in chloroform/methanol/water (2:1:0.8, v/v/v containing 25 nmol tridecanoic acid C13:0 as extraction internal standard) for total lipid analysis.

- *For lipid quantification:* Total lipid extraction was performed as described previously [Amiar *et al.*, 2016]. Parasites were prepared as described above except for the addition of 0.1 M of HCl to promote PA and LPA extraction. Pooled organic phase was subjected to biphasic separation by adding 0.1 M HCl. In both protocols, the organic phase was dried with speed vacuum and dissolved in 1-butanol.

Total lipids and phospholipids analysis by GC-MS

- *Total lipids analysis:* An aliquot of the lipid extract was dried in vacuum concentrator with 1 nmol pentadecanoic acid C15:0 as internal standard. Then the dried lipid was dissolved in the chloroform/methanol, (2:1, v/v) and derivatised with MethPrep II (Alltech). The resulting fatty acid methyl esters was analysed by GC-MS as described previously [Amiar *et al.*, 2016]. Fatty acid methyl esters were identified by their mass spectrum and retention time compared to authentic standards.

- *Lipid quantification:* Total lipid fraction was separated by 2D-HPTLC with 5 μ g PA(C17:0/C17:0) and 5 μ g LPA(C17:0) (Avanti Polar lipids) using chloroform/methanol/28% NH₄OH, 60:35:8 (v/v) as the 1st dimension solvent system and chloroform/acetone/methanol/acetic acid/water, 50:20:10:13:5 (v/v) as the 2nd dimension solvent system [Amiar *et al.*, 2016]. For DAG analysis, total lipid fraction was separated by 1D-HPTLC using hexan/diethylether/formic acid, 80:20:2 (v/v) as solvent system. The spot on the HPTLC corresponding to each lipid was scrapped off and lipids were directly derivatised with 0.5 M methanoic HCl in the presence of 1 nmol pentadecanoic acid C15:0 as internal standard. The resulting fatty acid methyl esters were extracted with hexane and analysed by GC-MS [Amiar *et al.*, 2016].

Results

Toxoplasma gondii possesses two acyl-glycerol acyltransferase of prokaryotic and eukaryotic origin

Protein sequence of plastidial ATS2 of *Arabidopsis thaliana* [Kim *et al.*, 2004] was used as a query sequence for BLAST in ToxoDB database [<http://toxodb.org/>]. We found two proteins with acyltransferase domain: TGME49_297640 and TGME49_240860. These two enzymes were analysed phylogenetically by comparing to different AGPATs from plant (chloroplast and endoplasmic reticulum), apicomplexan parasites, chromerids, bacteria, cyanobacteria, algae and diatoms. Phylogenetic tree showed a clustering of TGME49_297640 with prokaryotic clade that corresponds to bacterial, cyanobacterial, algal and plastidial enzymes while TGME49_240860 clustered with ER localized enzymes (Fig. 1A). Interestingly, *Cryptosporidium* spp. that lacks an apicoplast, contains only one AGPAT enzyme that clustered with eukaryotic enzymes from plant [Kim *et al.*, 2005], human [Wiemann *et al.*, 2001] and *P. yeolii* [Lindner *et al.*, 2014] suggesting that *Tg*AGPAT belongs to eukaryotic type enzymes (Fig. 1A). These data suggest that

Toxoplasma gondii virtually harbours two pathways for the *de novo* synthesis of phosphatidic acid: (i) a prokaryotic pathway homologous to that of photosynthetic plastid in plants and algae, and (ii) a eukaryotic pathway, which may be localized in the ER. In this study we referred TGME49_297640 to *Tg*ATS2 due to its homology and the nomenclature used for plastid AGPATs and TGME49_240860 to *Tg*AGPAT.

Multiple protein sequence alignments, which were performed by Clustal Omega [Li *et al.*, 2015] supported that both *Tg*ATS2 and *Tg*AGPAT might be 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase enzymes. Indeed, both of enzymes have highly conserved motifs that confer acyltransferase activity (Fig. 1B). The first motif is NHxSx₂D. The His and Asp residues from this motif were analysed in depth in human, mouse, plant and bacteria acyltransferases [Heath and Rock, 1998; Lewin *et al.*, 1999; Turnbull *et al.*, 2001; Yamashita *et al.*, 2007; Yamashita *et al.*, 2014]. Substitution of these residues leads loss of the acyltransferase activity while the ability to bind to the substrate still occurs. These data indicated that His and Asp residues in motif I play an important role in catalytic function of acyltransferase enzymes [Heath and Rock, 1998; Lewin *et al.*, 1999; Yamashita *et al.*, 2007]. However, the role of the Asp and Ser residues from motif I in the catalytic function and specificity to AGPAT enzymes still unknown. The

second motif is Fx₂R. This motif is highly conserved in plant and human AGPATs (Fig. 1B) and plays an important role in glycerol-3-phosphate binding. It was demonstrated that positive charge in this motif (Arg residue) is critical for binding to the phosphate [Lewin *et al.*, 1999; Yamashita *et al.*, 2007; Yamashita *et al.*, 2014]. This motif was also found present in Apicomplexa and Chromerids, but harbouring an additional amino acid residue between Phe and Arg residues (Fx₃R) (Fig. 1B). In the case of prokaryotic clade of enzyme sequences, the Fx₂R could not be found in plants. In bacteria, the motif GNLLIDR (or Gx₅R) is described as a second motif specific of acyltransferases [Lewin *et al.*, 1999; Yamashita *et al.*, 2014]. These Gx₅R residues are highly conserved in plant and coccidian (*Toxoplasma* and *Hammondia*) protein sequences. Nevertheless, the Fx₂R-like motif seems to be conserved in all prokaryotic enzymes and corresponds to the Fx₂K residues from *TgATS2* (Fig 1B). In this case, Lys may play a role of Arg in glycerol-3-phosphate binding. At this date, there is no data about this motif in prokaryotic 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase but it seems to be different from motif II from eukaryotic enzymes (Fig. 1B). The third motif is FPEGTR(S) and it is the most and strictly conserved motif in all enzymes with acyltransferase activity. In human AGPATs and bacterial acyl-lysophosphatidic acyltransferase, PlsC, Glu and Gly in this motif are very important for the enzymatic activity of AGPAT [Lewin *et al.*, 1999; Yamashita *et al.*, 2007; Yamashita *et al.*, 2014]. Both the negative charge and sidechain length of Glu are necessary at this position in motif III and insure with the motif II the binding to LPA substrate but not to acyl-CoA [Lewin *et al.*, 1999]. Ser also seems play a role in substrate binding but less than Glu. Gly is required for a catalytic activity of enzyme and its mutation leads to a dramatic reduction of AGPAT activity [Lewin *et al.*, 1999; Yamashita *et al.*, 2007; Yamashita *et al.*, 2014]. The last motif (IV) is the less conserved and consists mainly of P residue which is required for acyl-CoA binding. Previous reports suggested that the residues PI can be required for the catalytic activity of human AGPATs enzyme [Yamashita *et al.*, 2007] (Fig. 1B prokaryotic clade). In short, there is four motifs in 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase enzymes, motifs I and III are required for the catalytic function of enzyme, motifs II and III together bind to the glycerol-3-phosphate substrate and motif IV is required for acyl-CoA binding.

All of these similarities and motif conservations suggest that *T. gondii* harbours two distinguishable 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase enzymes. Our analysis suggests that *TgATS2* is a prokaryotic/plastid-like protein that could locate in the apicoplast whilst *TgAGPAT* is a eukaryotic-like enzyme that could thus be located in the ER. *Cryptosporidium* seems to possess a single AGPAT enzyme, which clustered with eukaryotic-type enzymes. This is consistent with the absence of apicoplast in *Cryptosporidium*. Together, this supports our hypotheses that *T. gondii* harbours two enzymes capable of *de novo* PA synthesis and likely located in the apicoplast and ER of the parasite.

T. gondii apicoplast and endoplasmic reticulum each has its own PA de novo synthesis pathway

To confirm bioinformatics analysis, we first generated independent parasite lines expressing a triple hemagglutinin (3xHA) tagged *TgATS2* protein. An HA coding sequence was added to the 3'-terminus of genes to maintain *TgATS2* physiological expression with its own promoter (Fig. 2A). Proper integration of the 3xHA into the single *ats2* locus was confirmed by PCR (Fig. 2B) and Western blot (Fig. 2C). Western blots revealed the presence of three distinct forms of *TgATS2*, >57 kDa, 57 kDa and 42 kDa, respectively (Fig. 2C). These likely correspond to the premature (pATS2, including the complete and/or partial N-terminal bipartite sequence) and mature (mATS2, apicoplast-resident) forms of the protein. Immunofluorescence assays (IFA) detected the co-localization of *TgATS2*-HA with a known apicoplast stromal marker, chaperonin 60 (CPN60) (Fig. 2D, lower panel). These data indicate that similarly as algal/plant ATS2, *TgATS2* is a plastid-resident protein. Then, we studied the maturation of *TgATS2* from its translation in the cytosol to its final destination in the apicoplast stroma using the 3xHA-tagged mutant. Like many stromal apicoplast proteins that are imported to the apicoplast via the canonical import pathway through the ER and eventually in the apicoplast, *TgATS2* gene should be transcribed in the nucleus and then synthesised protein sequence containing a bipartite N-terminal signal [Waller *et al.*, 1998; Waller *et al.*, 2000; Van Dooren *et al.*, 2002; Tonkin *et al.*, 2006]. Alignment of *TgATS2* with *TgAGPAT* or homologous revealed a long N-terminus extension of *TgATS2* that should contain the bipartite N-terminal signal. Bioinformatics analysis

could not identify any typical signal peptide (SP) or transit peptide (TP) residues but a putative transmembrane domain was identified using TMHMM, Phobius or TOPCONS softwares [Sonnhammer *et al.*, 1998; Käll *et al.*, 2004; Tsirigos *et al.*, 2015]. Interestingly, the long N-terminus extension contains six open reading frames at positions Met1, Met133, Met164, Met178, Met341 and Met356 (Fig. 2F). To identify the putative bipartite SP, TP or other apicoplast import signal as well as the right open reading frame, the five open reading frames 133, 164, 178, 341 and 356 of *TgATS2*-GFP were expressed transiently in *T. gondii*. As shown in Fig. 2G, *TgATS2*_{Met164} and *TgATS2*_{Met178}-GFP still localize in the apicoplast, suggesting that the region between residues 1-178 does not contain any apicoplast import sequence (either SP or TP sequences or other non-canonical sequences). *TgATS2*_{Met341}, and *TgATS2*_{Met356} appear to have lost the apicoplast localization and are found distributed in the cytosol in a punctate pattern, suggesting distinct vesicular/organelle localization outside the apicoplast. The observed pattern thus indicates that apicoplast import signal lies between residues 178-356. To confirm that these regions harbour SP and TP, *TgATS2*_{ΔNter-Trp578Met}-GFP that not contains the N-terminus extension and Trp578 was replaced by Met to generate a new open reading frame (Fig. 2F). The expression of *TgATS2*_{ΔNter-Trp578Met}-GFP led to a uniformal distribution of the enzyme throughout the parasite cytoplasm slightly differing from the *TgATS2*_{Met341}, and *TgATS2*_{Met356} localization (Fig. 2G). Thus, in absence of its long N-terminus extension, *TgATS2* appears to be a soluble cytosolic protein. All of these data support that *TgATS2* is a plant-like, apicoplast-localised enzyme bearing an N-terminal apicoplast import signal as described previously in many apicoplast proteins.

Similarly, we also generated a 3×HA tagged *TgAGPAT* protein expressing vector.

TgAGPAT-HA was transiently expressed because we were unable to obtain a stable tagged-transgenic line of this enzyme unlike *TgAGPAT* proteins despite the various approaches used to tag the protein within genome locus. Transient expression of *TgAGPAT*-HA with its native promoter using pLIC vector as described in Fig. 2H [Huyng and Carruthers, 2009] showed a perinuclear structure that corresponds to the parasite endoplasmic reticulum (Fig. 2I). Immunofluorescence assay with apicoplast maker CPN60 does not show any co-localization or contact between *TgAGPAT* and apicoplast (Fig. 2K lower panel). All of these results suggest that *T. gondii* harbours two

distinguishable acyltransferases putatively responsible for PA *de novo* synthesis pathways in the apicoplast and the endoplasmic reticulum, respectively.

TgATS2 functionally complements an E. coli mutant lacking the AGPAT function (plsC) but not TgAGPAT

To test whether *TgATS2* and *TgAGPAT* are 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase as predicted *in silico*, an *E. coli* strain SM2-1 $\Delta plsC$, lacking the pathway to form PA *de novo* was complemented with each *T. gondii* enzymes. This mutant is a temperature-sensitive mutant of lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT) activity [Coleman, 1990] (Fig. 3A, upper panel) and only grows at 30°C but not at 42°C. We cloned the coding sequence of each *TgATS2* and *TgAGPAT* from ToxoDB database into pQE30Xa expression vector (Quiagen). Bacterial *plsC* coding sequence was also cloned in this vector as a control of growth recovery of SM2-1 at 42°C. The resulting vectors were transformed into *E. coli* SM2-1 and an empty vector as a further negative control.

E. coli SM2-1 complemented with either of plasmids grew at 30°C but only that harbouring *EcplsC* (SM2-1 $\Delta plsC::plsC$) (Fig. 3A upper panel) or *TgATS2* (SM2-1 $\Delta plsC::TgATS2-1$ and 2) (Fig. 3A 3rd and 4th panels) grew at 42°C. At 42°C, the bacteria spots were similar than those at 30°C. Thus, *TgATS2* was active *in vivo* and complemented the defective *E. coli* LPAAT activity. However, *E. coli* SM2-1 harbouring plasmid containing *TgAGPAT* (SM2-1 $\Delta plsC::TgAGPAT-1$ and 2) (Fig. 3A 5th and 6th panels) grew at 30°C but not at 42°C. The analysis of amino acids sequence of *TgAGPAT* revealed a highly hydrophobic N-terminus from Met1 to Arg72 residues (TMHMM and TOPCONS). Therefore, it was hypothesized that the protein may have ended up in inclusion bodies. To test this, an expression vector containing *TgAGPAT* without the first 72 amino acids residues (*TgAGPAT* $_{\Delta Nter1-72}$) was generated. The recombinant expression of *TgAGPAT* $_{\Delta Nter1-72}$ (SM2-1 $\Delta plsC::TgAGPAT_{\Delta Nter1-72}$; Fig. 3A 7th panel) in the *E. coli* SM2-1 strain, however, did not rescue growth of bacteria at non permissive temperature. Possible explanation for this phenotype may be linked to specific post-translational modifications required for *TgAGPAT* activity. Overall, our results show that *TgATS2* synthesized in *E. coli* SM2-1 had 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase enzymatic activity *in vivo* unlike *TgAGPAT*.

CRISPR-Cas9 disruption of *TgATS2* affects proper daughter cell cytokinesis and intracellular growth of *T. gondii* tachyzoites

To investigate the importance of plastidial *ATS2* during tachyzoite stage of *T. gondii*, *TgATS2* locus was disrupted to generate a knock-out (KO) and knock-in (KI) mutant of *TgATS2*. CRISPR-Cas9 strategy was used (i) to integrate HXGPRT resistance cassette within the *TgATS2* ORF ($\Delta TgAS2$ -KI, Fig 3B left) or (ii) to fully replace the *TgATS2* ORF by HXGPRT cassette ($\Delta TgATS2$ -KO, Fig. 3B right) *via* double homologous recombination. Correct integration of HXGPRT cassette into the single *ats2* locus was confirmed by PCR (Fig. S1) and the enzyme loss was confirmed by Western blot analyses (Fig. 3 C and D) and immunofluorescence assays using an anti-HA antibody (Fig. 3E). Western Blot and IFA confirmed the loss of HA signal in both $\Delta TgATS2$ -KI and $\Delta TgATS2$ -KO.

Both $\Delta TgATS2$ mutants are viable but they are highly affected in their intracellular growth (Fig. 4). Plaque assays showed a defect in growth after 10 days post-infection of $\Delta TgATS2$, which displayed much smaller plaques than those from the parental line *TgATS2*-HA (Fig.4A). Further phenotypic analyses performed by semi-automated cell-based assay revealed that the parasite $\Delta TgATS2$ are able to invade and divide normally inside the host cells. However, there was a slowdown in division compared to *TgATS2*-HA parasites after 30 h post infection of HFF (Fig. 4B and C). This phenotype was not exacerbated when infected HFF were grown in a foetal bovine serum (FBS) limiting media (Fig. S2).

To investigate the phenotypes observed in $\Delta TgATS2$ parasites, we examined the different organelle structures during intracellular tachyzoite development by immunofluorescent microscopy assay (IFA; Fig. 4D). No defect in segregation and structure of apicoplast, mitochondrion, nucleus, micronemes and parasite pellicle (Fig. 4D) were observed. The $\Delta TgATS2$ parasites are also able to initiate the endodyogeny in a similar way as the parental line *TgATS2*-HA. This suggests that $\Delta TgATS2$ are able to initiate daughter cells formation and organelles segregation. However, $\Delta TgATS2$ parasites repeatedly displayed a much larger area at the center of big vacuoles (>4 parasites), which may correspond to an enlarged residual body (Fig. 4D, white asterisk, Fig. S3A-B). In addition, the daughter cells seem to be attached to each other after cell scission at their basal end when compared to parental parasites. This phenotype is observed using inner membrane complex marker IMC1 (Fig. 4E). Electron microscopic

(EM) analysis strengthened the IFA observations (Fig. 4F-I). Daughter cells were found surrounded by a large “cytoplasmic bag” that was maintaining them attached through extension from the plasma membrane after organelle segregation and cell division (Fig. 4F). These plasma membrane extensions did not correspond to usually described residual bodies [Muniz-Hernandez *et al.*, 2011] or as suggested by IFA observations. Indeed, (i) the position of parasite within the vacuole: not at the basal pole but surrounding the parasite (Fig. 4J) (ii) their contents (typical cytosolic material containing intact organelles such as mitochondria, Fig. S3C) (iii) their continuity around daughter cells along with their apposition to neighbouring cells within the vacuole (Fig. 4F) and (iv) the absence of proper plasma membrane constriction (Fig. 4F, G and I blue arrows, Fig. S3C). Altogether, these observations suggest a defect in the fission of the mother cell plasma membrane [Martins-Duarte *et al.*, 2016]. EM analysis also revealed a fragmented IMC (Fig. S3C) and dots/vesicles like appearance of the basal pole of daughter cells as indicated by a dark blue arrow (Fig. 4G, I), which seems to yet to be closed (Fig. S3C, light blue arrow). Despite this defect, the $\Delta TgATS2$ parasites are able to start a new cell division and new daughter cells emergence (Fig. 4I red arrow).

To investigate if all of these phenotypes are intracellular development-specific, we performed IFA on freshly egressed parasites using anti-Sag1 antibody. As shown in Fig. S3D, $\Delta TgATS2$ parasites seem to be bigger than the parental line extracellular parasites. In some cases, they also still attached to each other at the basal pole upon egress with a Sag1-stained large bag (Fig. S3D, white arrowhead). This bag can be observed in the parental line (Fig. S3D, second panel) but smaller than in $\Delta TgATS2$ parasites. However, these phenotypes were not observed frequently and we were unable to analyse it statically. Though, these data may confirm previous observations that concern a “cytoplasmic bag” formed during cell daughter formation, as shown in EM analysis (Fig. 4F-K, Fig. S3C) which can persist after parasite egress. Furthermore, we investigated the distribution of the width of basal complex during cell daughter division, especially during the last step of division in both $\Delta TgATS2$ and parental line using MORN1 as a marker of basal IMC1 gap [Gubbels *et al.*, 2006; Hu, 2008]. The expression of MORN1-mCherry in parental line showed a cone shape structure formed by MORN1 ring at the basal complex [Gubbels *et al.*, 2006; Hu, 2008] (Fig. S3E, yellow arrows, parental line panel). Likewise during endodyogeny, MORN1 ring is formed at

the basal complex of growing daughter cell (Fig. S3E, white arrowhead, parental line panel) and it is also located at the spindle pole as described previously [Gubbels *et al.*, 2006; Hu, 2008](Fig. S3E, blue arrows, parental line panel). In the $\Delta TgATS2$, these three MORN1 distributions were observed without non-significant difference compared to parental line (Fig. S3E, yellow and blue arrows, white arrowheads in $\Delta TgATS2$ panels). These observations indicate no defects in the parasite cytoskeleton monitored by MORN1 during cell division in $\Delta TgATS2$ and support our hypothesis suggesting a defect in mother cell membrane scission in $\Delta TgATS2$. This defect was only observed at the end of cell division and in some case in extracellular parasites. It appeared to be transient and potentially compensated by the parasite since parasites were affected in their intracellular division (Fig. 4A) but were still able to divide and egress to invade again. Taken together, all these data suggest that $\Delta TgATS2$ exhibits a serious defect in the cytokinesis due to the lack of proper cell membrane fission. This defect in cytokinesis may explain the slowdown in division and in growth fitness of $\Delta TgATS2$. Recently, it was reported that apicoplast *FASII* disruption also caused the cytokinesis failure [Martins-Duarte *et al.*, 2016]. These data suggest that PA assembly in apicoplast using *FASII* products is required for correct mother cell membrane fission and cytokinesis to complete tachyzoite division by endodyogeny.

TgATS2 disruption highly reduces C14:0 incorporation into *T. gondii* lipids

In apicomplexan parasites, apicoplast generates and is the main source of long-chain fatty acid ranging from C12:0 to C16:0 (as well as a minor amount of C18:0) by *de novo* synthesis using its *FASII* [Waller *et al.*, 1998, Ramakrishnan *et al.*, 2013; Botté *et al.*, 2013; Amiar *et al.*, 2016] Recently, we reported that the apicoplast harbours an essential LPA assembly pathway using C14:0 fatty acids but also C16:0 from *FASII* as major substrates [Amiar *et al.*, 2016]. The LPA generated via the algal-like *TgATS1* is likely to be the major substrate for both *TgATS2* and *TgAGPAT*.

To determine the role of *TgATS2* in lipid biosynthesis, total lipids from *TgATS2* mutant lines were analysed and quantified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Disruption of *TgATS2* induces a large significant reduction of the relative amount of C14:0 along with a reduced but significant decrease in C18:1, C20:1 and C22:2, although the latest is present in minute amounts in the parasite (Fig. 5A, B). In contrast, there was a concomitant increase of C18:0, C22:1, C24:1, C20:4, C20:5 and

C22:6 (Fig. 5B). These results suggest that presence of apicoplast-generated FA products and their derivatives are affected by the loss of *TgATS2* and could be compensated by an increase of scavenged/recycled FA. This hypothesis was tested and results are presented below.

To investigate which lipids were affected by the disruption of *TgATS2* and the resulting decrease in C14:0, lipid classes were separated by high performance thin layer chromatography (HPTLC) and were extracted for further analysis. Individual lipid species were then methanolysed and resulted FAMES were characterized and quantified by GC-MS analysis. We first analysed LPA and PA, the substrate and the product of *TgATS2*, respectively, both central precursors of all phospholipids (Fig. S4A). Major glycerolipids which are likely to be affected by *TgATS2* disruption were analysed as well to investigate further impact on parasite lipid synthesis and composition: DAG, PC, PE, PI, PS, PG and CL. An important accumulation of LPA is observed as well as PS (Fig. 5C). In contrast, the relative abundance of DAG and PG is decreased in $\Delta TgATS2$ while the relative abundance of PC, PI and PE seem not to be affected (Fig. 5C). Although present in very minute amount, LPA showed a slight decrease in C12:0 and a significant increase in C16:0 and C18:0 increased in $\Delta TgATS2$ (Fig. 5D) while C14:0 seems unaffected. In PA, although it was also weakly detected, it mainly contained C16:0 and C18:0, and C14:0, C18:1 and C22:1. Interestingly there was not significant difference in PA between $\Delta TgATS2$ and parental line (Fig. S4B). In DAG, however, an important decrease in C14:0 and an increase in C18:0 and to a lesser extent C16:0 (Fig. 5E). DAG is synthesized downstream of PA assembly (Fig. S4A) and is also important precursor for glycerophospholipids via the so-called Kennedy pathway. A significant reduction of C14:0 in DAG in $\Delta TgATS2$ may indicate that *TgATS2* catalyses the transfer of C14:0 from apicoplast to the *sn*-2 position of LPA for DAG synthesis in apicoplast of *T. gondii*. The increase of C18:0 in DAG suggested the presence of another pathway that might compensate the loss of *TgATS2*.

PA is also a precursor for phospholipids via CDP-DAG pathway such as PG, CL, PS and PI. The fatty acid content in these lipids may also reflect the PA synthesis in $\Delta TgATS2$ via CDP-DAG. These PLs analysis indicated a significant decrease in C18:1 in PG, PS, PC, PI and PE (Fig. 5F-J). 2D-HPTLC revealed an important decrease in phosphatidylglycerol (PG) spot in $\Delta TgATS2$ lines (Fig. 5C). These observations suggested that apicoplast PA

may be important for PG synthesis and related lipids in *T. gondii*. In PI, there was significant increase in C18:0 and decrease in C16:0 in $\Delta TgATS2$ (Fig. 5J). In $\Delta TgATS2$ mutant, C18:0 may compensate the decrease of C16:0 or C18:1 or both of them on LPA. PI also presents a significant decrease of C14:0 (Fig. 5I). All of these data confirm that PI is mainly synthesized using apicoplast product as we observed in the previous work [Amiar *et al.*, 2016]. The loss of *TgATS2* also indicated that PI can be compensated by another PA pathway that can incorporate C18:0 on LPA or by recycling fatty acids from other lipids (an increase of C20:5 fatty acid in PI, Fig. 5I). Concerning PE and PC (Fig. 5H and J), GC-MS analysis indicates a significant decrease in C14:0 and C18:1 while C16:0 (only for PC) and C18:0 are increased in both PLs species. All of these data support that *TgATS2* may have a specific role in PA assembly using C14:0 or C18:1 on LPA(14:0) or LPA(16:0) backbones. The origin of both C14:0 and C18:1 used by *TgATS2* for PA synthesis in the apicoplast is still unclear if fatty acids C18:1, i.e. originating *de novo* from *FASII* and then elongation for C18:1, [Ramakrishnan *et al.*, 2012, Amiar *et al.*, 2016] or from recycled scavenged lipids.

TgATS2 uses exclusively apicoplast-generated FA to be incorporated into bulk phospholipids

To determine the nature of fatty acid moieties that *TgATS2* utilizes to generate *de novo* PA, both $\Delta TgATS2$ and parental lines were labelled with U- ^{13}C -glucose for 72 h, parasites were then collected for total lipid extraction (Fig. 6A). This approach allows distinguishing FA moieties that are derived from the apicoplast *FASII* (^{13}C -labelled FA) or from either ER-based FA elongation pathway or scavenging pathway (unlabelled FA; Fig. 6A) [Ramakrishnan *et al.*, 2013; Amiar *et al.*, 2016]. Glucose is the unique source of carbon required for *FASII* pathway and then, U- ^{13}C -glucose facilitates FA tracking from *FASII* to membrane lipids.

GC-MS analysis of total lipids reveals that the ^{13}C incorporation into C14:0 fatty acid is reduced significantly in $\Delta TgATS2$ compared to the parental line: (i) in parental line, the whole carbon chain of the C14:0 is found labelled with ^{13}C , with a peak of incorporation for 12 and 14 carbons labelled, indicating that the whole chain is made from U- ^{13}C -glucose in the apicoplast, (ii) on the other hand in $\Delta TgATS2$, the major isotopologue form of C14:0 is the unlabelled one (Fig. 6B, M+0), and the ^{13}C

incorporation is reduced by ~80% in the fully labelled chain (Fig. 6B, m14). These results are consistent with our previous results on *TgATS1* (Fig. 6B). Importantly, this confirms that the C14:0 decreasing following disruption of *TgATS2* is of apicoplast *FASII* origin. Similarly, loss of *TgATS2* significantly reduces the incorporation of ^{13}C into C16:1, C18:1 and C20:1, though less marked than in C14:0 (Fig. 6C-E). For these FA species, the major isotopologue in the $\Delta TgATS2$ mutants are the unlabelled ones unlike the parental lines (M+14, M+16, M+18 for C16:1, C18:1 and C20:1, respectively, Fig. 6C-E) and the ^{13}C incorporation is reduced by at least 30% in the isotopologues of $\Delta TgATS2$ when compared to the parental ones (Fig. 6C-E) suggesting that *FASII* in $\Delta TgATS2$ is not defected but slowed down similarly as observed previously in *TgATS1*-iKO [Amiar *et al.*, 2016]. On the other hand, ^{13}C incorporation was not affected in C16:0 and C18:0 (Fig. S5B-G and Fig. 6J). Taken together, these data suggest that *TgATS2* is mainly responsible for the transfer of C14:0 from *FASII* and its derived products, C16:1 and C18:1 to LPA backbone, then forming PA precursors found in the total lipid from the parasite membranes.

Nutrient depletion enhances the synthesis of FA from apicoplast FASII whilst de novo lipid synthesis in the $\Delta TgATS2$ is only mildly affected in these culture conditions

Serum is lipid rich source and important for the growth of host cells and the parasites. Previously it was demonstrated that serum starvation increased *de novo* lipid synthesis in HFF [Fouts and Boothroyd, 2007]. At the same time, apicoplast lipid products are very important and critical for intracellular development of *T. gondii*. This apicoplast-based *de novo* lipid synthesis is directly linked to the availability of lipids in the external environment of the parasite [Crawford *et al.*, 2006; Mazumdar *et al.*, 2006; Daily *et al.*, 2007, Ramakrishnan *et al.*, 2013; Botté *et al.*, 2013; Shears *et al.*, 2016; Amiar *et al.*, 2016]. Thus, we hypothesized that in FBS-limiting conditions (i.e. serum starvation), the parasite may upregulate its *de novo* lipid synthesis pathways, including those in the apicoplast to compensate the loss. This, should, in theory, accentuate $\Delta TgATS2$ phenotype. To investigate this hypothesis, we conducted a similar approach of U- ^{13}C -glucose labelling but in a culture medium that only contained 0.2 % FBS, 5-fold lower than our standard FBS concentration. Interestingly, GC-MS analysis reveals that ^{13}C incorporation into C14:0 and C16:0 as well as their direct derived products C16:1;

C18:1 and C20:1, is increased in parental strain during FBS starvation when compared to normal growth conditions (Fig. 6F-I and K). In contrast, longer chain FA such as C18:0; C20:0 and C22:0 seem not to be affected by serum restriction (Fig. 6F-I and K). These suggest that the apicoplast *de novo* lipid synthesis is increased. In $\Delta TgATS2$, there is almost no difference in the ^{13}C incorporation to C14:0, C16:0 and C16:1 compared to standard media (Fig. 6J and K). However, the ^{13}C incorporation to C18:1 and C20:1 seem be less when compared to standard media (Fig. 6H-K). IFA did not show any visible phenotype in $\Delta TgATS2$ in serum stress compared to standard media (Fig. S2 and S3B). Taken together, these results suggest that normal parasites could adapt their lipid synthesis based on nutrient availability whereas $\Delta TgATS2$ may be unable to detect or to respond to serum stress or both and may be another source of PA compensates ATS2 disruption.

Apicoplast biogenesis depends on the cooperation between TgATS2 and TgAGPAT during tachyzoite intracellular development

The disruption of *TgATS2* affects parasite growth, daughter cells cytokinesis and division as well as apicoplast-derived FA assembly for biosynthesis of bulk phospholipid classes. Since $\Delta TgATS2$ is viable, the other acyltransferase, *TgAGPAT* in endoplasmic reticulum might be compensating the role of *TgATS2* in some ways. Here, to investigate the role of *TgAGPAT* in *de novo* PA synthesis in tachyzoite intracellular development, we first tried to generate an inducible knockdown of *TgAGPAT* using TATi system by one step protocol. This protocol consists in the 5'-replacement of the native *TgAGPAT* promoter with the tetracycline-activated promoter (t7s4) in a $\Delta ku80$ /TATi background [Meissner *et al.*, 2001; Sheiner *et al.*, 2011]. The *TgAGPAT* locus was also refractory to C-Terminal epitope tagging with any of the used tag (HA, Ty). Nevertheless and despite many attempts, we were never able to obtain such mutant. We, thus hypothesized that the *TgAGPAT* locus modification might be lethal for parasite. Therefore, to disturb *TgAGPAT*, a transient CRISPR-Cas9 KO mutant strategy was attempted in the parental and the $\Delta TgATS2$ backgrounds to obtain a simple $\Delta TgAGPAT$ mutant in $\Delta ku80$ -RH strain and a double $\Delta TgATS2/\Delta TgAGPAT$ mutant, respectively (Fig. 7). gRNA sequence in *TgAGPAT* was chosen within the catalytic domain (motif II; Fig. 7A) to ensure the disruption of *TgAGPAT* activity. Using

IFA, we analysed only parasites that expressed Cas9-GFP, which is the indication of CRISPR-Cas9 derived $\Delta TgAGPAT$. Parasites without GFP fluorescence were considered as non-mutated. In Fig. 7B, $\Delta TgAGPAT$ strain did not show defect in growth and daughter cells division when compared to non-mutated parasites (GFP and no GFP, Fig.7B second line). In addition, apicoplast marker CPN60 showed correct apicoplast segregation at 48 h post transfection (yellow arrows in Fig. 7B). This suggested that loss of $TgAGPAT$ did not affect parasite intracellular development for 48 h. In the $\Delta TgATS2/\Delta TgAGPAT$ double mutant, presented an important defect in apicoplast biogenesis was observed within 48 h post transfection (Fig. 7C). $\Delta TgATS2/\Delta TgAGPAT$ double mutant parasites had new daughter cells that did not contain any apicoplast during and after endodyogeny (white arrows, Fig.7C, D). Some double mutant parasite had only one of the two daughter cells harbouring an apicoplast (yellow arrows: apicoplast correct structure, white arrows: no apicoplast structure; Fig. 7C first and second left panels). These results suggested that *de novo* PA synthesis by both $TgATS2$ and $TgAGPAT$ may be important for the biogenesis of apicoplast during daughter cells formation thus for parasite survival.

Discussion and conclusion

The intracellular lifestyle of *T. gondii* requires an important amount of lipids for several membrane biogenesis. Parasite needs either *de novo* synthesized and scavenged lipids from host cell to maintain its own integrity, to ensure daughter cells membrane biogenesis and the membrane of parasitophorous vacuole within which the parasites survive and proliferate. The recent studies have shown the important role of apicoplast and endoplasmic reticulum in response to this important lipid requirement. Apicoplast provides long chain fatty acids (C14:0 and C16:0) *via* a prokaryotic *FASII* pathway and the major precursor of all glycerolipids synthesis LPA *via* $ATS1$ activity. Whereas ER harbours elongation and desaturation machineries [Ramakrishnan *et al.*, 2013; Botté *et al.*, 2013; Lindner *et al.*, 2014; Ramakrishnan *et al.*, 2015; Shears *et al.*, 2016; Amiar *et al.*, 2016]. Our study on $TgATS2$ in apicoplast and $TgAGPAT$ gave a new insight to those apicoplast-ER compartmentation of lipid synthesis.

T. gondii apicoplast conserve a prokaryotic-type PA synthesis pathway

In this study, we identified two putative *sn*-acylglycerol 3-phosphate acyltransferases in *T. gondii*, *TgATS2* and *TgAGPAT*. *TgATS2* conserved amino acids sequence across the prokaryotic organisms as well as plastidial *ATS2* described in plant [Bourgis *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004] and *E. coli* enzyme *PlsC* [Coleman *et al.*, 1990]. *TgATS2* is located in the apicoplast, a non-photosynthetic plastid-like organelle acquired by a secondary endosymbiosis of red algae. Then, we provide the first evidence that the apicoplast harbours a full prokaryotic-type PA synthesis pathway in *T. gondii* in complement to our previous study [Amiar *et al.*, 2016]. The acyltransferase activity of *TgATS2* was confirmed in the *E. coli* temperature deficient mutant MS2-1. Indeed, *TgATS2* rescue the growth of MS2-1 in non-permissive temperature (42°C) while *TgAGPAT* do not. It was already observed in *P. yeolii* that only one of the two *sn*-acylglycerol 3-phosphate acyltransferases predicted in the parasite complement a bacterial mutant [Lindner *et al.*, 2014]. However, this result can only suggest that *TgAGPAT* is inactive in a bacterial system but cannot confirm that is not a *sn*-acylglycerol 3-phosphate acyltransferase enzyme. Future activity and affinity tests are required to confirm an eukaryotic acyltransferase activity of *TgAGPAT* in ER.

In plant, PA synthesized in chloroplast is mainly used for PG via CDP-DAG pathway [Kunst *et al.*, 1988; Ohlrogge and Browse, 1995]. Using 2D-HPLC analysis, we noted that PG is the most reduced phospholipid classes in $\Delta TgATS2$ mutant (Fig. 5C). Then we noted a significant decrease in the relative abundance of C18:1 and C22:1. These fatty acids may provide from fatty acid elongation pathway in ER [Ramakrishnan *et al.*, 2012; Ramakrishnan *et al.*, 2015]. While the relative abundance of C16:0 and C18:0 in PG is increased in the mutant compared to parental line (Fig. 5F). These finding suggest that PG synthesis may be partially compensated by another pathways in $\Delta TgATS2$: either another PA synthesis pathway in *T. gondii* or lipid scavenging from host cell. Taken together, our results demonstrated that PA synthesis pathway in the apicoplast is a prokaryotic heritage from algal chloroplast which is a main source of PG in *T. gondii*.

Plastidial PA is involved in membrane lipid dynamic

In our study, disruption of *TgATS2* caused a delay in the cell daughter division in tachyzoite. This is likely due to the lack of PA generated from apicoplast (Fig. 3).

TgATS2 mutants displayed a much larger area “cytoplasmic bag”, which may correspond to an enlarged residual body (Fig. 4D, F, I, Fig S2A, B) that was maintaining the daughter cells attached to each other at the posterior pole (Fig 4F, I, Fig S2C). These observations suggest a defect in mother cell scission during cytokinesis. An equivalent phenotype was already observed when *FASII* pathway is chemically inhibited by Triclosan, *fabI* inhibitor [Martins-Duarte *et al.*, 2016]. This suggests that lipids synthesized in the apicoplast are involved in this process. In fact it was reported that PA is implied in membrane cell curvature during exocytosis and synaptic vesicles formation from neuronal cells in human cell [Schmidt *et al.*, 1999; Scales and Scheller, 1999; Gallop *et al.*, 2005; Chasserot-Golaz *et al.*, 2010]. This is possible that *TgATS2* dependent PA is involved in the mother cell scission. PA has cone shape structure and this structure helps changes in the shape of the membrane and facilitates curvature and invagination [Kooijman *et al.*, 2003; Kooijman *et al.*, 2005]. In addition, the presence of PA in the membrane can promote the penetration of dynamin into lipid monolayer [Burger *et al.*, 2000; Shin and Loewen, 2011]. Dynamin is a large GTPase involved in the regulation of membrane constriction and fission in receptor-mediated endocytosis and synaptic vesicle recycling [Burger *et al.*, 2000]. In *T. gondii*, a dynamin related protein, DrpA is required for apicoplast segregation during cell division [van Dooren *et al.*, 2009]. For this physical characteristic of PA for cell membrane curvature and for dynamin penetration, PA from *TgATS2* plays important role. In fact this delay in cell daughter scission causes perturbation in parasite growth, but *TgATS2* mutant is still viable.

ATS2 mediated membrane phospholipid synthesis

Most of observed phospholipids are significantly affected in a decrease of C14:0, more than 50% of relative abundance (mol %) in DAG and PG and PS, up to 20% in PC and up to 10 % in PE (Fig. 5E-J) by the loss of *TgATS2* in *T. gondii*. Using U-¹³C-glucose incorporation to follow *FASII*-fatty acids synthesis in $\Delta TgATS2$, we observed reduced ¹³C incorporation, up to 25%, in total lipid fraction (Fig. 6J). An almost similar reduction was observed, although it was more important upon *TgATS1* activity loss [Amiar *et al.*, 2016]. In the case of $\Delta TgATS2$, we suggested that reduction of ¹³C incorporation into C14:0 is directly linked to the loss of *TgATS2*. When *TgATS1* is lost, the mutant was

lethal and the bulk phospholipid synthesis was significantly reduced [Amiar *et al.*, 2016]. However, $\Delta TgATS2$ mutant is viable and is affected in the incorporation of C14:0 mainly into membrane lipid classes. Furthermore, PL class analysis revealed an important decrease in C18:1a (*cis* form) in PC, PS and PE, while in PI is decreased to a minor extent, in $\Delta TgATS2$. These four PL classes constitute the major of membrane's lipid matrix in eukaryotic cells [Opekarova and Tanner, 2002; Holtuis and Menon, 2014]. In Apicomplexa parasites, PC is the major PL in parasite membrane, up to 75 % of total PLs, in apicoplast membranes and rhoptries [Foussard *et al.*, 1991; Vial *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2005; Welte *et al.*, 2007; Besteiro *et al.*, 2008; Botté *et al.*, 2013]. Facilitated by its cylindrical shape, PC is ideally suited to providing a stable and fluid matrix for cellular membranes [Holtuis and Menon, 2014]. Whereas PE is the second most abundant PL classes in parasite plasma membrane [Foussard *et al.*, 1991; Gupta *et al.*, 2005; Welte *et al.*, 2007]. In contrast to *TgATS1* inducible mutant, *TgATS2* disruption did not affect negatively the relative abundance of total PC, PI and PE. In both PC and PE there was an important increase of C16:0 and C18:0 in these PLs. Analysis of enriched pellicular membrane fraction of *T. gondii*, reported that C18:1 is the most abundant fatty acids found in both whole-cell and in pellicular PLs, up to 30-40% of total fatty acids [Foussard *et al.*, 1991; Besteiro *et al.*, 2008]. In living cells, the rigid kink of the *cis*-double bond of C18:1 lowers the packing density of the acyl chains, which increases membrane fluidity [Nishida and Murata, 1996; Los and Murata, 2004; Holtuis and Menon, 2014]. Moreover, *T. gondii* exhibits particularly high membrane fluidity when studied by fluorescence polarization [Gallois *et al.*, 1988]. Probably, this *T. gondii* membrane characteristic is may be due to the important abundance of C18:1 in membrane. We suggest that the decrease of C18:1 and the increase of both C16:0 and C18:0 abundance in the membrane phospholipids may reduce membrane fluidity and packing defects which may affect membrane integrity, lipid-protein interaction and may be membrane dynamic during constriction. In cyanobacteria *Synechocystis*, the inactivation of desaturase enzyme *fad12* results in a dramatic decrease in membrane fluidity [Wada *et al.*, 1990]. The mutant is unable to introduce a double bound Δ^{12} on C18 of membrane lipids. In this study, it was shown that this mutant had lost the ability to acclimate to low temperatures. However, the complementation of *fad12* mutant with another desaturase enzyme *desA* restore the chilling tolerance with

an important increase in unsaturated fatty acids [Wada *et al.*, 1990]. Synthesis of unsaturated fatty acids to compensate a decrease in membrane fluidity at a low temperature was well demonstrated in *E. coli* as well as in *A. thaliana* [Sinensky, 1973; Wolter *et al.*, 1992; Wu and Browse, 1996]. Indeed, *A. thaliana fab1* (palmitoyl-ACP elongase) mutant presents an accumulation of C16:0 in the cellular lipids whether the level of *cis*-unsaturated fatty acid of PG was highly reduced, up to 40% in the mutant plant [Wu and Browse, 1996]. The similar decrease in C18:1a level was observed in membrane PL species, up to 50% in PG, 20% in PC and up to 9% in PE, in $\Delta TgATS2$.

In other hand, the decrease of C16:0 and C18:1a fatty acids moieties in PI can support our hypothesis. PI and its phosphorylated derived, phosphoinositids, are concentrated in highly dynamic sub-compartment, as well as apicoplast membranes [Tawk *et al.*, 2011; Botté *et al.*, 2013]. PI is constituted mainly on C16:0 and C18:1), by 36 % and 24% respectively, of total fatty acid abundance in parasite pellicle [Foussard *et al.*, 1991]. Moreover, PI and phosphoinositids are an anionic lipids and their accumulation at the membrane surface determined the surface charge of membranes, as well as PS [Magalhaes and Glogauer, 2009; Holtuis and Menon, 2014]. This charge is very important for protein recruitment and stabilizing at the biological membrane [Opekarova and Tanner, 2002; Holtuis and Menon, 2014; Vigant *et al.*, 2015]. Our data may suggest that *TgATS2* disruption may affect a correct distribution of PI species in parasite membrane which can contribute to a defect in membrane dynamic in

$\Delta TgATS2$ parasites may be compensate by exogenous fatty acid scavenging as well as C20:4 and C20:5 [Elsen *et al.*, 2013] or be the significant increase of another anionic PL abundance (PS) in mutant. According to these hypothesis, we attempt to complement $\Delta TgATS2$ lines with “prokaryotic-like” PA(C14:0/C14:0) and PA(C16:0/C18:1) and suggesting that this PA may compensate the delay in the growth in the mutant, according to ability of *T. gondii* to scavenge PA during intracellular development [Charron and Sibley, 2002]. Surprisingly, these two PA forms trigger weakly parasite growth in both parental line and $\Delta TgATS2$ lines as observed in plaque assays (Fig. S6) but did not restore growth delay observed in the mutant.

In summary, in this study we provide evidence that prokaryotic PA *de novo* synthesis in apicoplast is required for the synthesis of phospholipids classes with the most

abundant fatty acid species contained in parasite membranes. However, the loss of this pathway can be compensated by another PA synthesis or scavenged PL with almost different fatty acid species, as well as C18:0 which may affect membrane dynamic, especially during mother cell scission.

T. gondii modulate FASII pathway in response to availability of lipid source from the environment FBS deprivation

$\Delta TgATS2$ line has reduced incorporation of ^{13}C label to fatty acids, especially to C14:0. This suggests that *FASII* dependent fatty acids from apicoplast, is reduced in the mutant whereas *FASII* is in function as fully ^{13}C labelled C14:0 is detected (Fig. 6). This is consistent with our previous work on *TgATS1* activity [Amiar *et al.*, 2016]. Parasites have two source of fatty acids; i.e. apicoplast *FASII* and scavenged lipids from host. Since host cells are grown in the medium supplemented with serum, the serum is also the source of lipids. In human cells, the serum deprivation increase the expression gene implied in lipid synthesis [Fouts and Boothrod, 2007]. FBS starvation may have the same effect on *T. gondii* and then parasite should increase *FASII* and derived pathways in response to nutrient stress similarly to *P. falciparum* [Botté *et al.*, 2013]. Indeed the incorporation of ^{13}C in *FASII*-derived fatty acids and their derived-FAE fatty acids is increased in *T. gondii* upon FBS starvation (Fig. 6J-K) while the abundance of unlabelled form of this fatty acids seems decreased (Fig 6F-I, M+0 isotopologue). The unlabelled fatty acid may correspond to scavenged/remodelled fatty acid. These data suggest that *T. gondii* could sense the environmental conditions from inside the host cell and adapt its metabolic pathways, as well the host cell [Fouts and Boothroyd, 2007]. In this case, the increase of the apicoplast fatty acid synthesis upon nutrient/FBS starvation. This could be similar to what has been observed in *P. Falciparum* when *FASII* activity was enhance upon depleted-lipid culture [Botté *et al.*, 2013]

In the current study provides evidence of the important role of prokaryotic-PA *de novo* synthesis pathway in apicoplast to assemble *FASII* derived fatty acids into membrane phospholipids required for a correct membrane dynamic, especially during daughter cell formation and membrane scission. However, the loss of *TgATS2* activity can be

compensated by the incorporation of probably scavenged fatty acid into membrane lipid probably *via* TgAGPAT activity in the ER, because *T. gondii* seem to be unable to use PA from exogenous environment. Indeed a transient CRISPR-Cas9 double mutant of $\Delta TgATS2/\Delta TgAGPAT$ presents a defect in apicoplast biogenesis at 48h post-transfection, in parasite expressing Cas9-GFP while the simple mutant $\Delta TgAGPAT$ seems not. These phenotypes were observed 48 post-transfection and may be an off-targeting of CRISPR-Cas9. However, a recent study on GDP-mannose dehydratase (GMD) excluded the off-targeting of CRISPR-Cas9 [Bandini *et al.*, 2016]. GMD is involved in fucose synthesis pathway in *T. gondii* [Bandini *et al.*, 2016]. When Cas9 is expressed with GMD gRNA, no fucose was detected in transfected parasites while the expression of Cas9 without gRNA did not affect the fucose synthesis [Bandini *et al.*, 2016]. Although, further analysis of simple and double mutants, $\Delta TgAGPAT$ and $\Delta TgATS2/\Delta TgAGPAT$ for better understanding of the assembly of fatty acids into the bulk of membrane's lipid.

References

- Amiar, S., *et al.* (2016). "Apicoplast-Localized Lysophosphatidic Acid Precursor Assembly Is Required for Bulk Phospholipid Synthesis in *Toxoplasma gondii* and Relies on an Algal/Plant-Like Glycerol 3-Phosphate Acyltransferase." *PLoS Pathog* **12**(8): e1005765.
- Awai, K., *et al.* (2006). "A phosphatidic acid-binding protein of the chloroplast inner envelope membrane involved in lipid trafficking." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(28): 10817-10822.
- Bandini, G., *et al.* (2016). "O-fucosylated glycoproteins form assemblies in close proximity to the nuclear pore complexes of *Toxoplasma gondii*." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Baschong, W., *et al.* (2011). "Triclosan is minimally effective in rodent malaria models." *Nat Med* **17**(1): 33-34; author reply 34-35.
- Besteiro, S., *et al.* (2008). "Lipidomic analysis of *Toxoplasma gondii* tachyzoites rhoptries: further insights into the role of cholesterol." *Biochem J* **415**(1): 87-96.
- Bisanz, C., *et al.* (2006). "Toxoplasma gondii acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors." *Biochem J* **394**(Pt 1): 197-205.
- Botte, C. Y., *et al.* (2013). "Atypical lipid composition in the purified relict plastid (apicoplast) of malaria parasites." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(18): 7506-7511.
- Bourgis, F., *et al.* (1999). "A plastidial lysophosphatidic acid acyltransferase from oilseed rape." *Plant Physiol* **120**(3): 913-922.
- Burger, K. N., *et al.* (2000). "Dynamin is membrane-active: lipid insertion is induced by phosphoinositides and phosphatidic acid." *Biochemistry* **39**(40): 12485-12493.
- Charron, A. J. and Sibley, L. D. (2002). "Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*." *J Cell Sci* **115**(Pt 15): 3049-3059.

- Chasserot-Golaz, S., *et al.* (2010). "Lipid dynamics in exocytosis." Cell Mol Neurobiol **30**(8): 1335-1342.
- Coleman, J. (1990). "Characterization of Escherichia coli cells deficient in 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase activity." J Biol Chem **265**(28): 17215-17221.
- Crawford, M. J., *et al.* (2006). "Toxoplasma gondii scavenges host-derived lipoic acid despite its de novo synthesis in the apicoplast." EMBO J **25**(13): 3214-3222.
- Daily, J. P., *et al.* (2007). "Distinct physiological states of Plasmodium falciparum in malaria-infected patients." Nature **450**(7172): 1091-1095.
- Denny, P., *et al.* (1998). "Evidence for a Single Origin of the 35 kb Plastid DNA in Apicomplexans." Protist **149**(1): 51-59.
- Dereeper, A., *et al.* (2008). "Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist." Nucleic Acids Res **36**(Web Server issue): W465-469.
- Fichera, M. E. and Roos, D. S. (1997). "A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites." Nature **390**(6658): 407-409.
- Foussard, F., *et al.* (1991). "Lipids and fatty acids of tachyzoites and purified pellicles of Toxoplasma gondii." Parasitol Res **77**(6): 475-477.
- Fouts, A. E. and Boothroyd, J. C. (2007). "Infection with Toxoplasma gondii bradyzoites has a diminished impact on host transcript levels relative to tachyzoite infection." Infect Immun **75**(2): 634-642.
- Gallois, Y., *et al.* (1988). "Membrane fluidity of Toxoplasma gondii: a fluorescence polarization study." Biol Cell **62**(1): 11-15.
- Gallop, J. L., *et al.* (2005). "Endophilin and CtBP/BARS are not acyl transferases in endocytosis or Golgi fission." Nature **438**(7068): 675-678.
- Gao, J., *et al.* (2015). "Mutations in the Prokaryotic Pathway Rescue the fatty acid biosynthesis1 Mutant in the Cold." Plant Physiol **169**(1): 442-452.
- Gubbels, M. J., *et al.* (2006). "A MORN-repeat protein is a dynamic component of the Toxoplasma gondii cell division apparatus." J Cell Sci **119**(Pt 11): 2236-2245.
- Guindon, S., *et al.* (2010). "New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0." Syst Biol **59**(3): 307-321.
- Gulati, S., *et al.* (2015). "Profiling the Essential Nature of Lipid Metabolism in Asexual Blood and Gametocyte Stages of Plasmodium falciparum." Cell Host Microbe **18**(3): 371-381.
- Gupta, N., *et al.* (2005). "Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite Toxoplasma gondii arrests its growth." J Biol Chem **280**(16): 16345-16353.
- Gupta, N., *et al.* (2012). "The obligate intracellular parasite Toxoplasma gondii secretes a soluble phosphatidylserine decarboxylase." J Biol Chem **287**(27): 22938-22947.
- Hartmann, A., *et al.* (2014). "Phosphatidylethanolamine synthesis in the parasite mitochondrion is required for efficient growth but dispensable for survival of Toxoplasma gondii." J Biol Chem **289**(10): 6809-6824.
- He, C. Y., *et al.* (2001). "A plastid segregation defect in the protozoan parasite Toxoplasma gondii." EMBO J **20**(3): 330-339.

- Heath, R. J. and Rock, C. O. (1998). "A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis." J Bacteriol **180**(6): 1425-1430.
- Heinz, E. (1977). Enzymatic reactions in galactolipid biosynthesis. In Tevini M and Lichtenthaler HK (eds) Lipids and Lipid Polymers, Springer Verlag, Berlin. pp. 102-20.
- Holthuis, J. C. and Menon, A. K. (2014). "Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis." Nature **510**(7503): 48-57.
- Hu, K. (2008). "Organizational changes of the daughter basal complex during the parasite replication of *Toxoplasma gondii*." PLoS Pathog **4**(1): e10.
- Huynh, M. H. and Carruthers, V. B. (2009). "Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain lacking Ku80." Eukaryot Cell **8**(4): 530-539.
- Janouskovec, J., *et al.* (2010). "A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(24): 10949-10954.
- Kall, L., *et al.* (2004). "A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method." J Mol Biol **338**(5): 1027-1036.
- Kelly, A. A., *et al.* (2016). "Synthesis and transfer of galactolipids in the chloroplast envelope membranes of *Arabidopsis thaliana*." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(38): 10714-10719.
- Kim, H. U. and Huang, A. H. (2004). "Plastid lysophosphatidyl acyltransferase is essential for embryo development in *Arabidopsis*." Plant Physiol **134**(3): 1206-1216.
- Kohler, S., *et al.* (1997). "A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites." Science **275**(5305): 1485-1489.
- Kooijman, E. E., *et al.* (2003). "Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid." Traffic **4**(3): 162-174.
- Kooijman, E. E., *et al.* (2005). "Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid." Biochemistry **44**(6): 2097-2102.
- Kunst, L., *et al.* (1988). "Altered regulation of lipid biosynthesis in a mutant of *Arabidopsis* deficient in chloroplast glycerol-3-phosphate acyltransferase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(12): 4143-4147.
- Larkin, M. A., *et al.* (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." Bioinformatics **23**(21): 2947-2948.
- Lewin, T. M., *et al.* (1999). "Analysis of amino acid motifs diagnostic for the sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction." Biochemistry **38**(18): 5764-5771.
- Li, G. and Xue, H. W. (2007). "*Arabidopsis* PLDzeta2 regulates vesicle trafficking and is required for auxin response." Plant Cell **19**(1): 281-295.
- Li, W., *et al.* (2015). "The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework." Nucleic Acids Res **43**(W1): W580-584.
- Li-Beisson, Y., *et al.* (2010). "Acyl-lipid metabolism." Arabidopsis Book **8**: e0133.
- Lim, L., *et al.* (2009). "New proteins in the apicoplast membranes: time to rethink apicoplast protein targeting." Trends Parasitol **25**(5): 197-200.
- Lindner, S. E., *et al.* (2014). "Enzymes involved in plastid-targeted phosphatidic acid synthesis are essential for *Plasmodium yoelii* liver-stage development." Mol Microbiol **91**(4): 679-693.

- Los, D. A. and Murata, N. (2004). "Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals." Biochim Biophys Acta **1666**(1-2): 142-157.
- MacRae, J. I., *et al.* (2012). "Mitochondrial metabolism of glucose and glutamine is required for intracellular growth of *Toxoplasma gondii*." Cell Host Microbe **12**(5): 682-692.
- Macrae, J. I., *et al.* (2014). "Plasmodium falciparum is dependent on de novo myo-inositol biosynthesis for assembly of GPI glycolipids and infectivity." Mol Microbiol **91**(4): 762-776.
- Martins-Duarte, E. S., *et al.* (2016). "Apicoplast fatty acid synthesis is essential for pellicle formation at the end of cytokinesis in *Toxoplasma gondii*." J Cell Sci **129**(17): 3320-3331.
- Mazumdar, J., *et al.* (2006). "Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in *Toxoplasma gondii*." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(35): 13192-13197.
- McConkey, G. A., *et al.* (1997). "Inhibition of Plasmodium falciparum protein synthesis. Targeting the plastid-like organelle with thiostrepton." J Biol Chem **272**(4): 2046-2049.
- McFadden, G. I., *et al.* (1996). "Plastid in human parasites." Nature **381**(6582): 482.
- McLeod, R., *et al.* (2001). "Triclosan inhibits the growth of Plasmodium falciparum and Toxoplasma gondii by inhibition of apicomplexan Fab I." Int J Parasitol **31**(2): 109-113.
- Meissner, M., *et al.* (2001). "Modulation of myosin A expression by a newly established tetracycline repressor-based inducible system in *Toxoplasma gondii*." Nucleic Acids Res **29**(22): E115.
- Mendonsa, R. and Engebrecht, J. (2009). "Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and phospholipase D-generated phosphatidic acid specify SNARE-mediated vesicle fusion for prospore membrane formation." Eukaryot Cell **8**(8): 1094-1105.
- Mullin, K. A., *et al.* (2006). "Membrane transporters in the relict plastid of malaria parasites." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(25): 9572-9577.
- Muniz-Hernandez, S., *et al.* (2011). "Contribution of the residual body in the spatial organization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites within the parasitophorous vacuole." J Biomed Biotechnol **2011**: 473983.
- Nishida, I. and Murata, N. (1996). "Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The Crucial Contribution of Membrane Lipids." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **47**: 541-568.
- Ohlrogge, J. and Browse, J. (1995). "Lipid biosynthesis." Plant Cell **7**(7): 957-970.
- Opekarova, M., *et al.* (2002). "Phosphatidyl ethanolamine is essential for targeting the arginine transporter Can1p to the plasma membrane of yeast." Biochim Biophys Acta **1564**(1): 9-13.
- Ramakrishnan, S., *et al.* (2012). "Apicoplast and endoplasmic reticulum cooperate in fatty acid biosynthesis in apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*." J Biol Chem **287**(7): 4957-4971.
- Ramakrishnan, S., *et al.* (2013). "Lipid synthesis in protozoan parasites: a comparison between kinetoplastids and apicomplexans." Prog Lipid Res **52**(4): 488-512.
- Ramakrishnan, S., *et al.* (2015). "The intracellular parasite *Toxoplasma gondii* depends on the synthesis of long-chain and very long-chain unsaturated fatty acids not supplied by the host cell." Mol Microbiol **97**(1): 64-76.
- Sampels, V., *et al.* (2012). "Conditional mutagenesis of a novel choline kinase demonstrates plasticity of phosphatidylcholine biogenesis and gene expression in *Toxoplasma gondii*." J Biol Chem **287**(20): 16289-16299.

- Scales, S. J. and Scheller, R. H. (1999). "Lipid membranes shape up." Nature **401**(6749): 123-124.
- Schmidt, A., *et al.* (1999). "Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid." Nature **401**(6749): 133-141.
- Seron, K., *et al.* (2000). "Molecular cloning, functional complementation in *Saccharomyces cerevisiae* and enzymatic properties of phosphatidylinositol synthase from the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*." Eur J Biochem **267**(22): 6571-6579.
- Shears, M. J., *et al.* (2016). "Characterization of the *Plasmodium falciparum* and *P. berghei* glycerol 3-phosphate acyltransferase involved in FASII fatty acid utilization in the malaria parasite apicoplast." Cell Microbiol.
- Sheiner, L., *et al.* (2011). "A systematic screen to discover and analyze apicoplast proteins identifies a conserved and essential protein import factor." PLoS Pathog **7**(12): e1002392.
- Shin, J. J. and Loewen, C. J. (2011). "Putting the pH into phosphatidic acid signaling." BMC Biol **9**: 85.
- Sonnhammer, E. L., *et al.* (1998). "Pfam: multiple sequence alignments and HMM-profiles of protein domains." Nucleic Acids Res **26**(1): 320-322.
- Tawk, L., *et al.* (2011). "Phosphatidylinositol 3-monophosphate is involved in toxoplasma apicoplast biogenesis." PLoS Pathog **7**(2): e1001286.
- Tonkin, C. J., *et al.* (2006). "N-terminal positively charged amino acids, but not their exact position, are important for apicoplast transit peptide fidelity in *Toxoplasma gondii*." Mol Biochem Parasitol **150**(2): 192-200.
- Tsigos, K. D., *et al.* (2015). "The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides." Nucleic Acids Res **43**(W1): W401-407.
- Turnbull, A. P., *et al.* (2001). "Analysis of the structure, substrate specificity, and mechanism of squash glycerol-3-phosphate (1)-acyltransferase." Structure **9**(5): 347-353.
- van den Elsen, L. W., *et al.* (2013). "n-3 Long-chain PUFA reduce allergy-related mediator release by human mast cells in vitro via inhibition of reactive oxygen species." Br J Nutr **109**(10): 1821-1831.
- van Dooren, G. G., *et al.* (2002). "Processing of an apicoplast leader sequence in *Plasmodium falciparum* and the identification of a putative leader cleavage enzyme." J Biol Chem **277**(26): 23612-23619.
- van Dooren, G. G., *et al.* (2009). "A novel dynamin-related protein has been recruited for apicoplast fission in *Toxoplasma gondii*." Curr Biol **19**(4): 267-276.
- van Schaijk, B. C., *et al.* (2014). "Type II fatty acid biosynthesis is essential for *Plasmodium falciparum* sporozoite development in the midgut of *Anopheles* mosquitoes." Eukaryot Cell **13**(5): 550-559.
- Vaughan, A. M., *et al.* (2009). "Type II fatty acid synthesis is essential only for malaria parasite late liver stage development." Cell Microbiol **11**(3): 506-520.
- Vial, H. J., *et al.* (2003). "Phospholipids in parasitic protozoa." Mol Biochem Parasitol **126**(2): 143-154.
- Vigant, F., *et al.* (2015). "Broad-spectrum antivirals against viral fusion." Nat Rev Microbiol **13**(7): 426-437.

-
- Wada, H., *et al.* (1990). "Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation." Nature **347**(6289): 200-203.
 - Waller, R. F., *et al.* (1998). "Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12352-12357.
 - Waller, R. F., *et al.* (2000). "Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway." EMBO J **19**(8): 1794-1802.
 - Welti, R., *et al.* (2007). "Lipidomic analysis of *Toxoplasma gondii* reveals unusual polar lipids." Biochemistry **46**(48): 13882-13890.
 - Wiemann, S., *et al.* (2001). "Toward a catalog of human genes and proteins: sequencing and analysis of 500 novel complete protein coding human cDNAs." Genome Res **11**(3): 422-435.
 - Wilson, R. J. and Williamson, D. H. (1997). "Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa." Microbiol Mol Biol Rev **61**(1): 1-16.
 - Yamashita, A., *et al.* (2007). "Topology of acyltransferase motifs and substrate specificity and accessibility in 1-acyl-sn-glycero-3-phosphate acyltransferase 1." Biochim Biophys Acta **1771**(9): 1202-1215.
 - Yamashita, A., *et al.* (2014). "Glycerophosphate/Acylglycerophosphate acyltransferases." Biology (Basel) **3**(4): 801-830.
 - Yu, B., *et al.* (2004). "Loss of plastidic lysophosphatidic acid acyltransferase causes embryolethality in *Arabidopsis*." Plant Cell Physiol **45**(5): 503-510.
 - Yu, M., *et al.* (2008). "The fatty acid biosynthesis enzyme *FabI* plays a key role in the development of liver-stage malarial parasites." Cell Host Microbe **4**(6): 567-578.

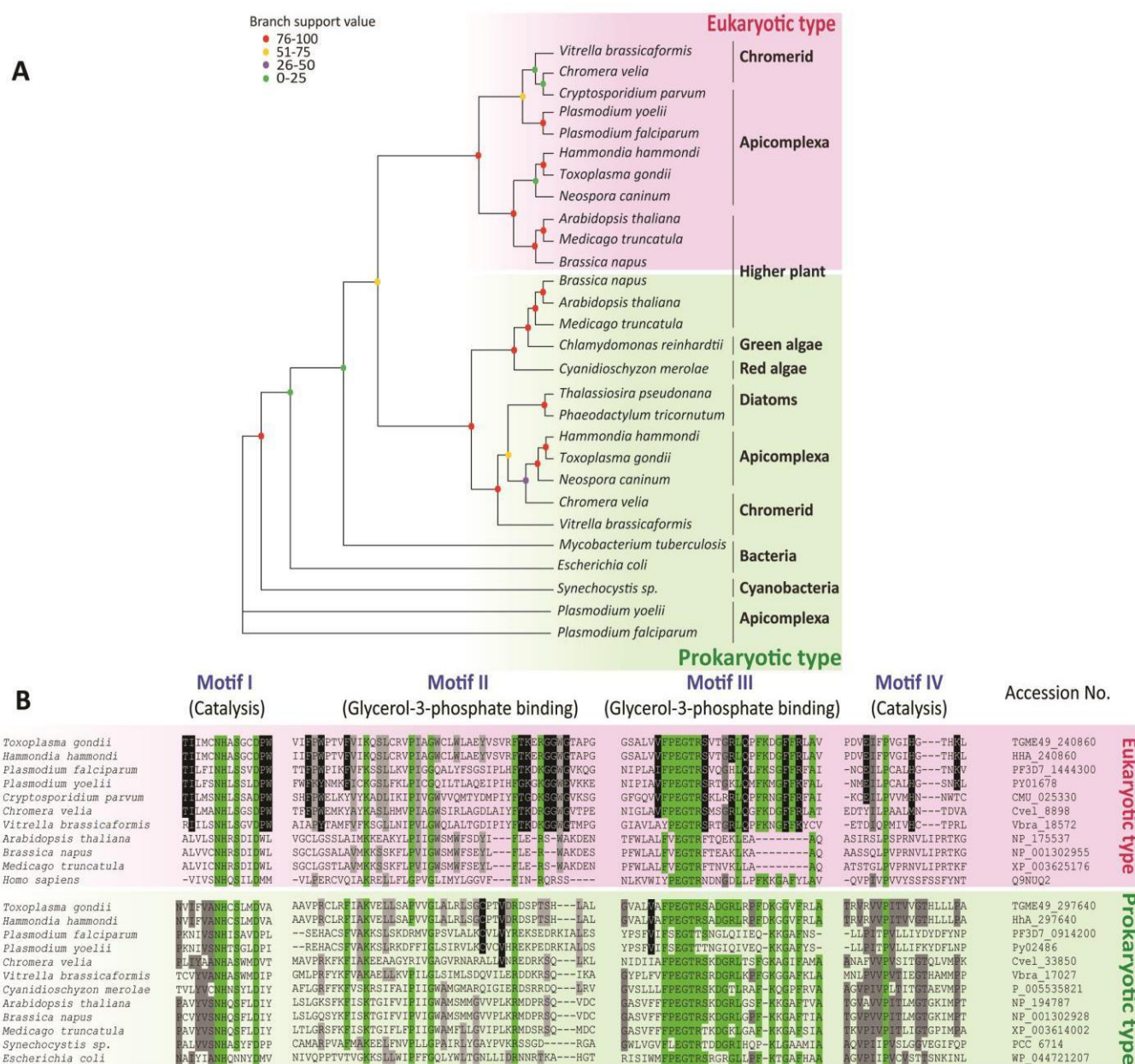


Figure 1: *TgATS2* is conserved specifically among members of the prokaryotic lineage while *TgAGPAT* is conserved among the eukaryotic lineage. A) Phylogenetic analysis of *TgAST2* and *TgAGPAT* and orthologs from various organisms. Maximum likelihood phylogenies of prokaryotic and eukaryotic acylglycerol acyl transferase activity of 28 enzymes. Branch support values are indicated for each node in different colours (0–25, purple; 25–50, green; 50–75, orange; 75–100, red) B) Multiple protein alignment of the putative orthologues of *TgATS2* from plant chloroplast and *TgAGPAT* from ER. Green colour represent 100% identity which correspond to amino acids residues of active domain (Motif I-IV), gray corresponds to amino acid residues similarity among each clade while black corresponds to amino acids conserved in Alveolate enzymes in both clades.

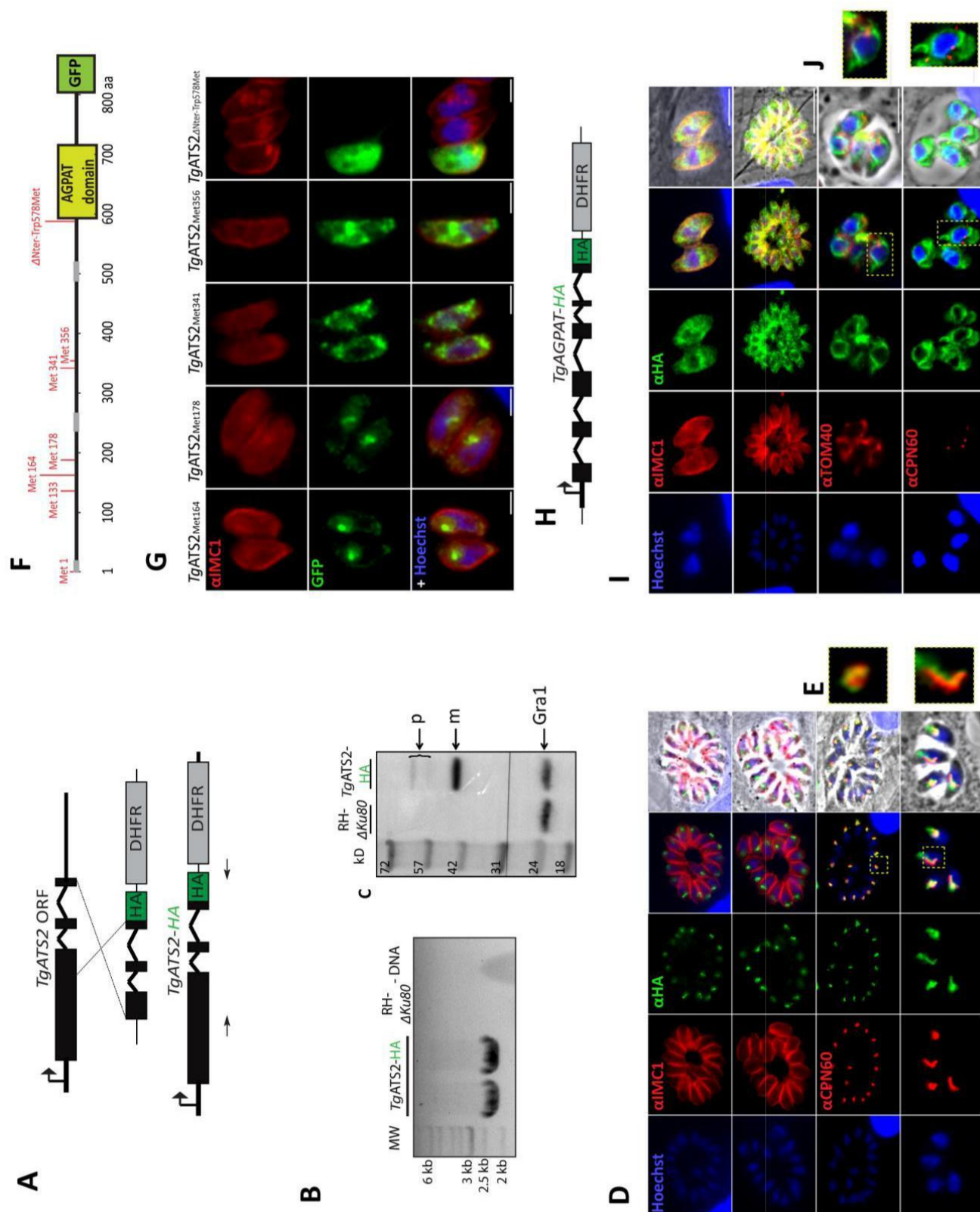


Figure 2: *T. gondii* expresses two distinct acyltransferase 3-acyltransferases located in the apicoplast and ER, *TgATS2* and *TgAGPAT* respectively. A) Scheme for 3'-insertional tagging of *TgATS2* with a C-terminal HA tag. Plasmid harbouring crossover homologous region of gene was linearized with *BspI* enzyme and transfected into

tachyzoites (RH- $\Delta ku80$), followed by pyrimethamine drug selection and cloned by limiting dilution. Arrow indicated primer set used for clones screen by (B) PCR analysis using primers specific for the *TgATS2* coding region (left), targeting construct integration (right). C) Western blot analysis was of proteins extracts from RH- $\Delta ku80$ and *TgATS2*-HA using anti HA antibody. *TgATS2*-HA was detected three bands: two pre-mature forms (p, >57 KD~57KD) and the mature form (m, ~42KD). Antibody anti-Gra1 was used as a loading control. D) Immunofluorescence assay of stable transgenic tachyzoites expressing *TgATS2*-HA under the control of its endogenous promoter performed using anti-HA and Alexa488 antibodies. *TgATS2* co-localise with apicoplast marker CPN60, zoomed in (E). F) The N-terminal region of *TgATS2* contains six alternative translation start sites. The respective coding sequences of four of them (*TgATS2*_{Met164}-GFP, *TgATS2*_{Met178}-GFP, *TgATS2*_{Met341}-GFP and *TgATS2*_{Met356}-GFP) and the complete depleted N-terminal form (*TgATS2* Δ Nter-Typ578Met-GFP) were expressed transiently with GFP marker in *T. gondii* (G). Immunofluorescence assay were performed using anti HA and IMC1 antibodies. H) Scheme for 3'-insertional tagging of *TgAGPAT* with a C-terminal HA tag. Plasmid harbouring a full length of endogenous *TgAGPAT* promoter and *TgAGPAT* ORF was transfected into tachyzoites (RH- $\Delta ku80$). I-) Immunofluorescence assay of transient tachyzoites expressing *TgAGPAT*-HA under the control of its endogenous promoter performed using anti-HA and Alexa488 antibodies. *TgAGPAT* localise in a perinuclear structure may correspond to ER as zoomed in (J). Scale bars=2 μ m

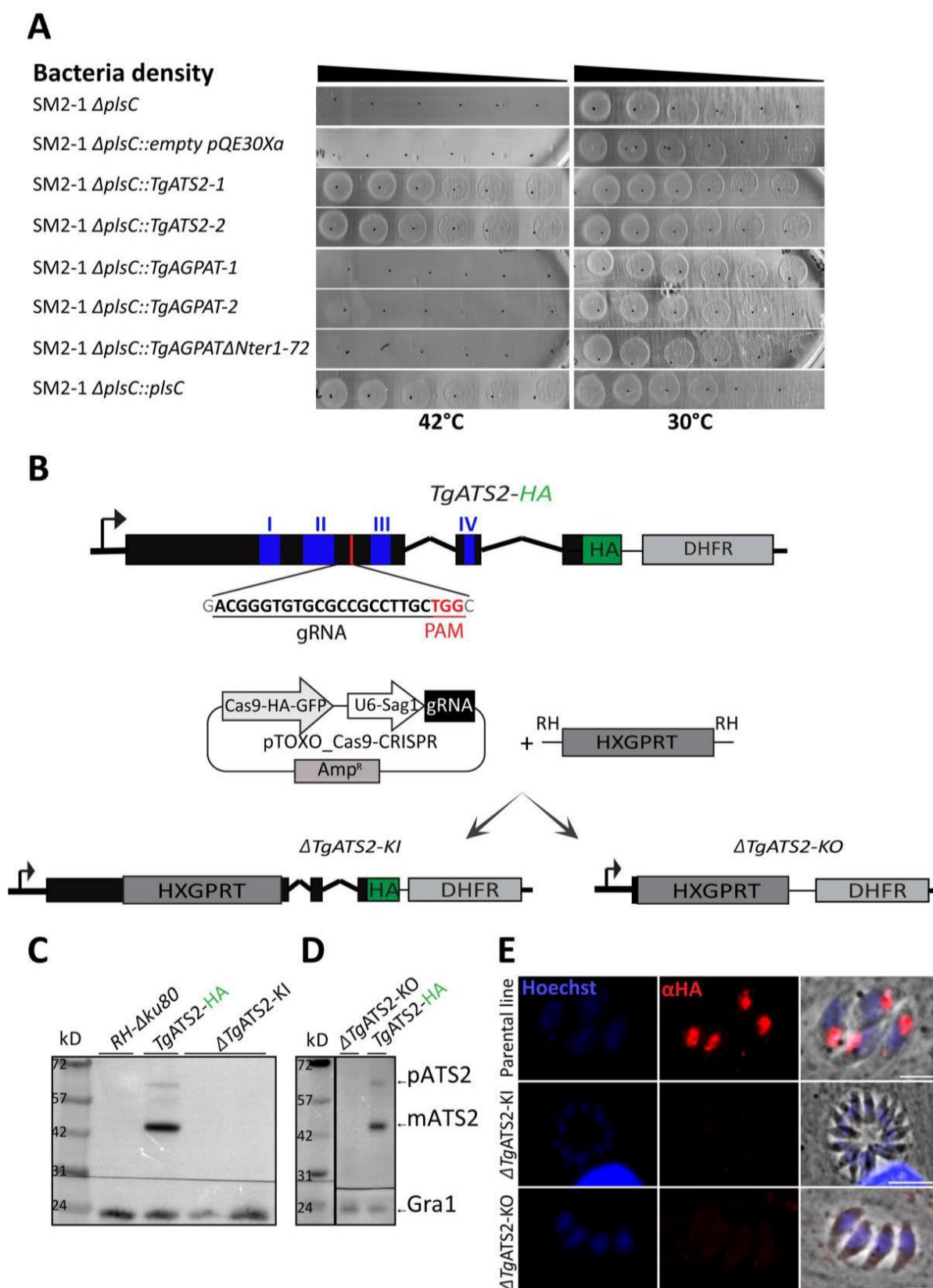


Figure 3: Expression of *TgATS2* in *E. coli* strain SM2-1 temperature-sensitive mutant defective of LPAAT activity, restore efficiently growth defect of mutant at non-permissive temperature. A) Bacteria transformed with expression vectors: empty pQE30Xa, pQE30Xa-*TgATS2* (full length coding sequence 1, 2), pQE30Xa-*TgAGPAT* (full

length coding sequence 1, 2), pQE30Xa-TgAGPAT Δ Nter1-72 (putative mature protein sequence) and pQE30Xa+Ecplsc, were grown at 30°C or 42°C for 20h and then photographed. The experience was conducted three times independently using 2 independent clones. B) Scheme for CRISPR strategy for integration of HXGPRT cassette within *TgATS2* ORF (knock in; KI) and *TgATS2* gene replacement by HXGPRT cassette (knock out; KO) mediated by the expression of pTOXO-Cas9-GFP-CRISPR vector harbouring *TgATS2* gRNA. Catalytic motifs are indicated in blue and PAM site for Cas9 cleavage activity in red. pTOXO-Cas9-GFP-CRISPR::*TgATS2* and HXGPRT with crossover homologous region of interest were transfected into freshly egressed tachyzoites (*TgATS2*-HA). Protein *TgATS2*-HA loss was confirmed by Western-blot analysis in both *TgATS2*-KI (C) and *TgATS2*-KO (D) using HA-antibody. Anti-Gra1 was used as a loading control. E) Immunofluorescence analysis confirming the HA-signal loss in Δ *TgATS2* lines using anti-HA and Alexa546 antibodies. Scale bars=2 μ m

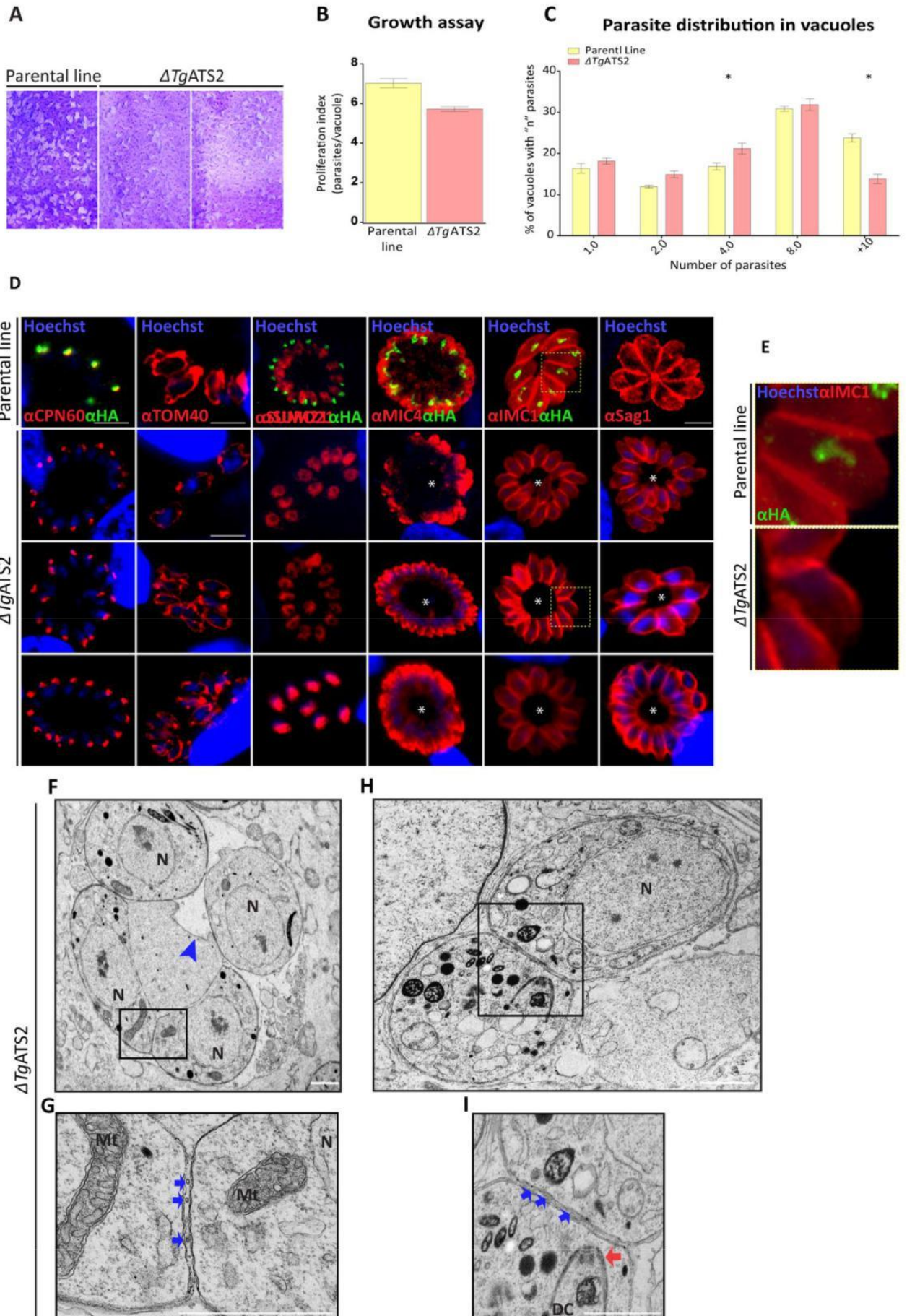


Figure 4: *TgATS2* activity loss reduces growth fitness of *T. gondii* tachyzoites. A) Plaque assay performed with the parental line and $\Delta TgATS2$. B) Plaque numbers of individual strains from panel (A). C) Growth fitness analysis performed using semi-automated cell-based assay on infected cells with parental line and $\Delta TgATS2$ 30 h post-infection. Parasite numbers within vacuoles were counted to obtain the proliferative index which was evaluated by parasite/vacuole number ratio, in two independent $\Delta TgATS2$ lines conducted in triplicate. D) Immunofluorescence performed to investigate the structure of different organelles: apicoplast (CPN60), mitochondrion (TOM40), nucleus (Sumo21), microns (MIC2), parasite plasma membrane (Sag1) and inner membrane complex (IMC1). E) Inserts from (D). Scale bars=2 μm . F-I) Transmission electronic microscopy of $\Delta TgATS2$ showed an enlarged “cytoplasmic bag”, a defect in mother cell membrane constriction, fragmented IMC (F) and cell daughter attachment at the basal pole (F-I). * *P values* of ≤ 0.05 were considered significant.

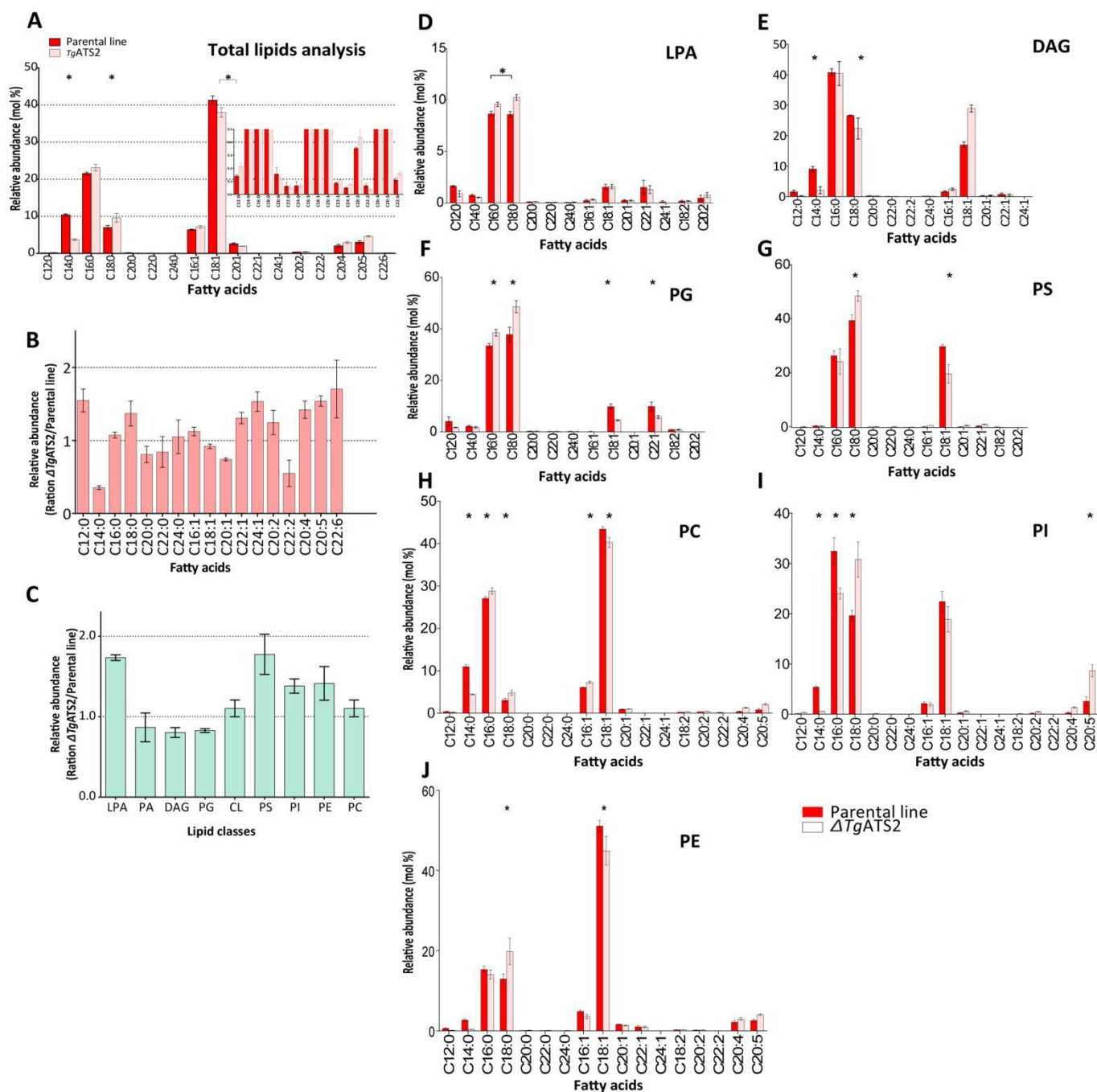


Figure 5: Analysis of FA composition of total lipid fraction and bulk phospholipid classes. A) Lipids were extracted after 72 h post-infection from harvested tachyzoites (parental line and $\Delta TgATS2$), reprivatized to form fatty acid methyl esters (FAMES), and analysed by GC-MS to determine. The analysis of relative abundance of each FAMES species (B) showed a change in $\Delta TgATS2$ mutant, compared to parental line, 72 h post-infection. Analysis of total abundance of different lipid classes: LPA, PA, DAG, PG, CL, PS, PE, PC and PI (C) and the individual molecular species of both LPA (D), DAG (E), PG (F), PS (G), PC (H), PI (I) and PE (J). The nomenclature (Cx:y) is shown where x is the

number of carbons and y is the number of insaturations in the fatty acid chain. These analyses were conducted in three independent $\Delta TgATS2$ clones using four replicates of each clone. * P values of ≤ 0.05 were considered significant.

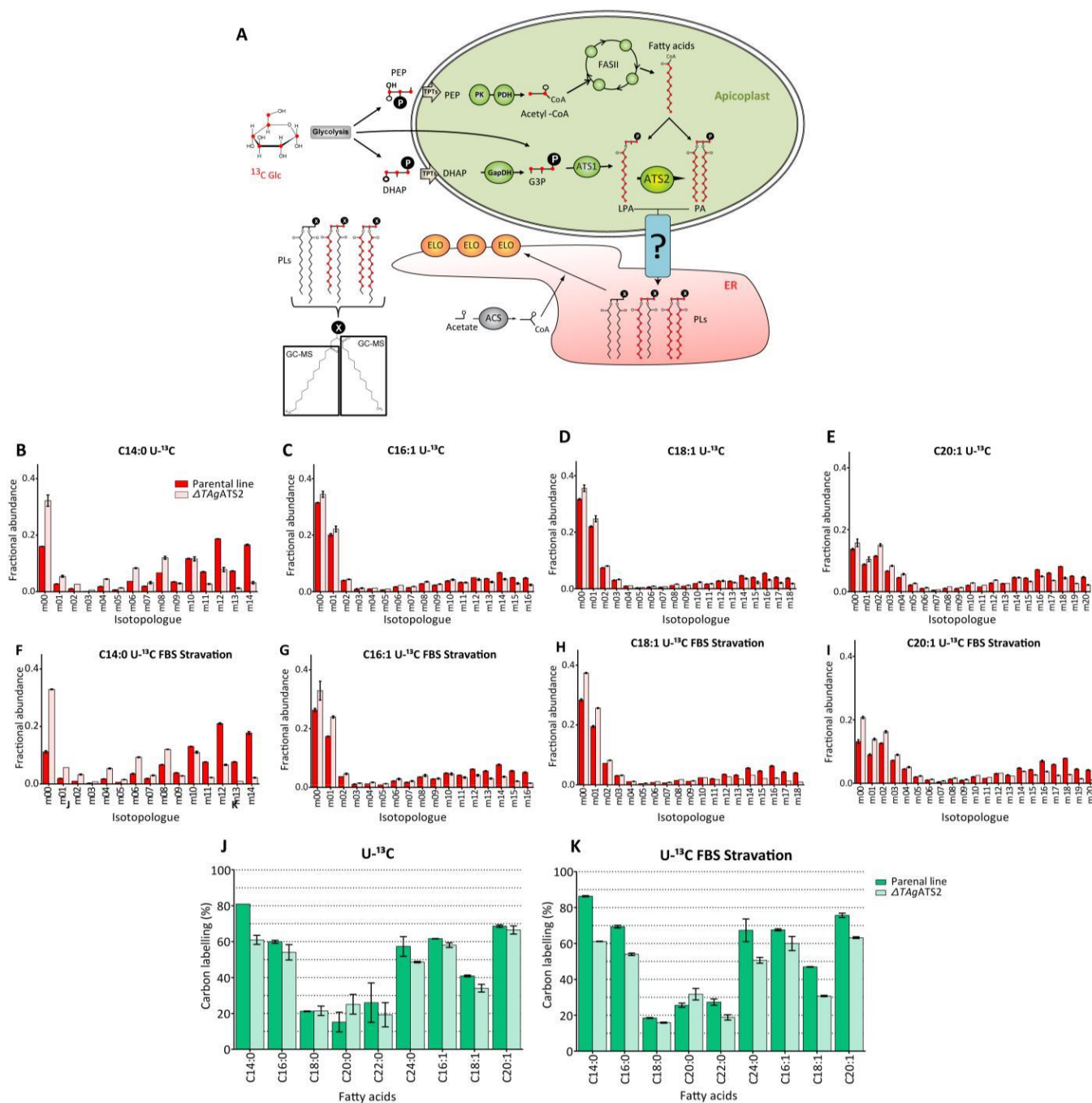


Figure 6: Stable isotope labelling of *FASII* fatty acid synthesis and elongation in $\Delta TgATS2$ and parental line. A) ^{13}C -carbon labelling strategies to assess the role of $\Delta TgATS2$ in the incorporation of *FASII* fatty acid into bulk phospholipids synthesis. $\Delta TgATS2$ tachyzoites were labelled with U- ^{13}C -glucose for 72 h in normal condition (B-E) or FBS starvation conditions (F-I). Lipids were extracted, derivatized to form fatty acid methyl esters (FAMES), and analysed by GC-MS to determine ^{13}C incorporation and mass isotopologue distributions (MID) in different fatty acid species FA (C14:0) (B and F), (C16:1) (C and G), (C18:1) (D and H) and (C20:1) (E and I) from U- ^{13}C -glucose, in

normal culture condition and FBS starvation condition, respectively. The x-axis indicates the number of ^{13}C atoms in each FAME, where 'm0' indicates the monoisotopic mass containing no ^{13}C atoms, while 'mX' represents that mass with 'X' ^{13}C atoms incorporated. More FAMEs are in Supplementary data. Mean label incorporation from U- ^{13}C -glucose into FAMEs in normal culture condition (J) and in FBS starvation conditions (K). These analyses were conducted in two independent $\Delta TgATS2$ clones using four replicates of each clone.

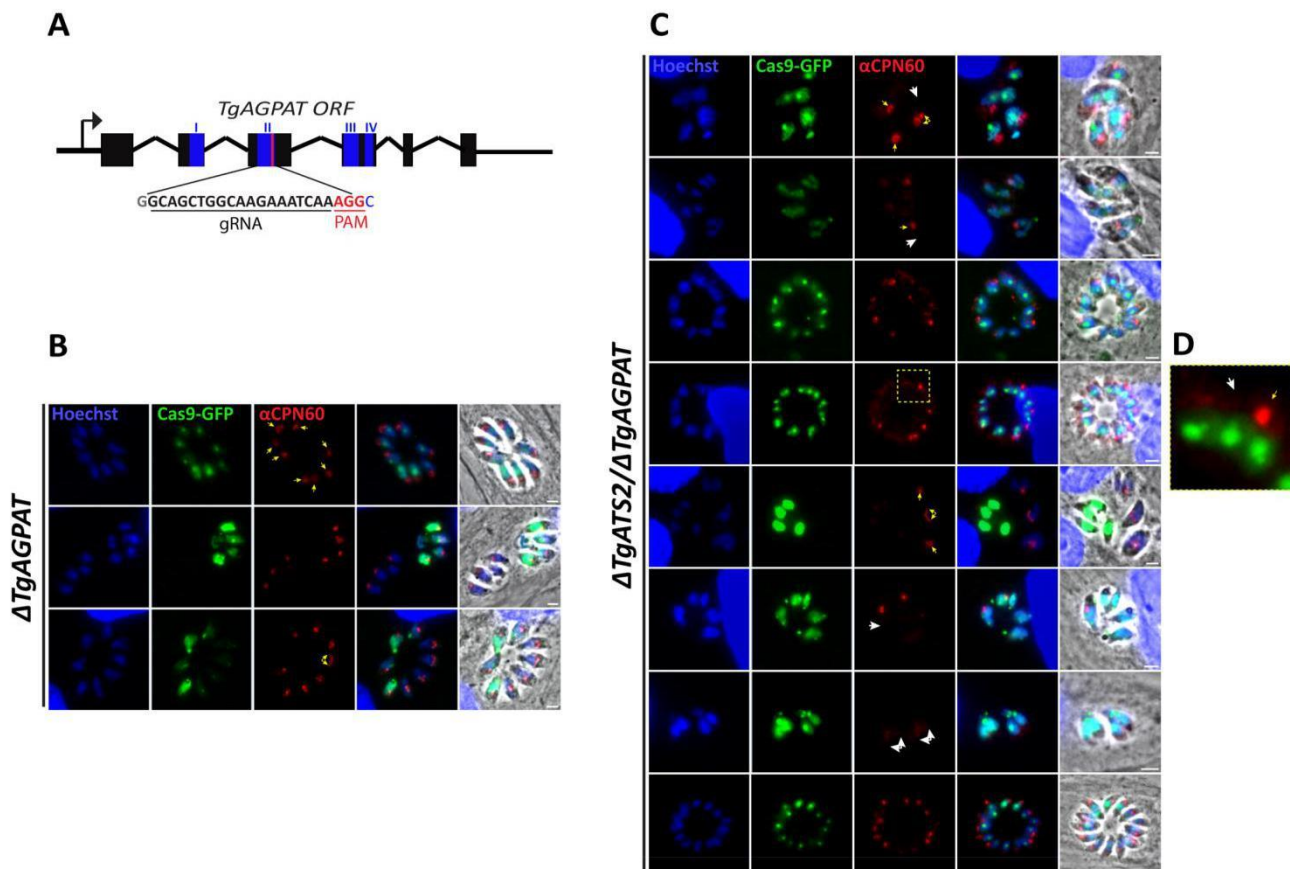


Figure 7: Disruption of both *TgATS2* and *TgAGPAT* using CRISPR-Cas9 affect apicoplast biogenesis. A) Scheme for CRISPR strategy using Cas9 and a gRNA targeting a second motif of catalytic domain within *TgAGPAT* ORF. Immunofluorescence assay performed 48 h post-transfection of RH- $\Delta ku80$ (B) and $\Delta TgATS2$ parasites (C) with pTOXO-Cas9-GFP-CRISPR::*gTgAGPAT*, using anti-CPN60 antibody as apicoplast marker. Scale bars=2 μ m. Yellow arrows indicate a correct apicoplast segregation in tachyzoites and white arrows indicate apicoplast structure loss.

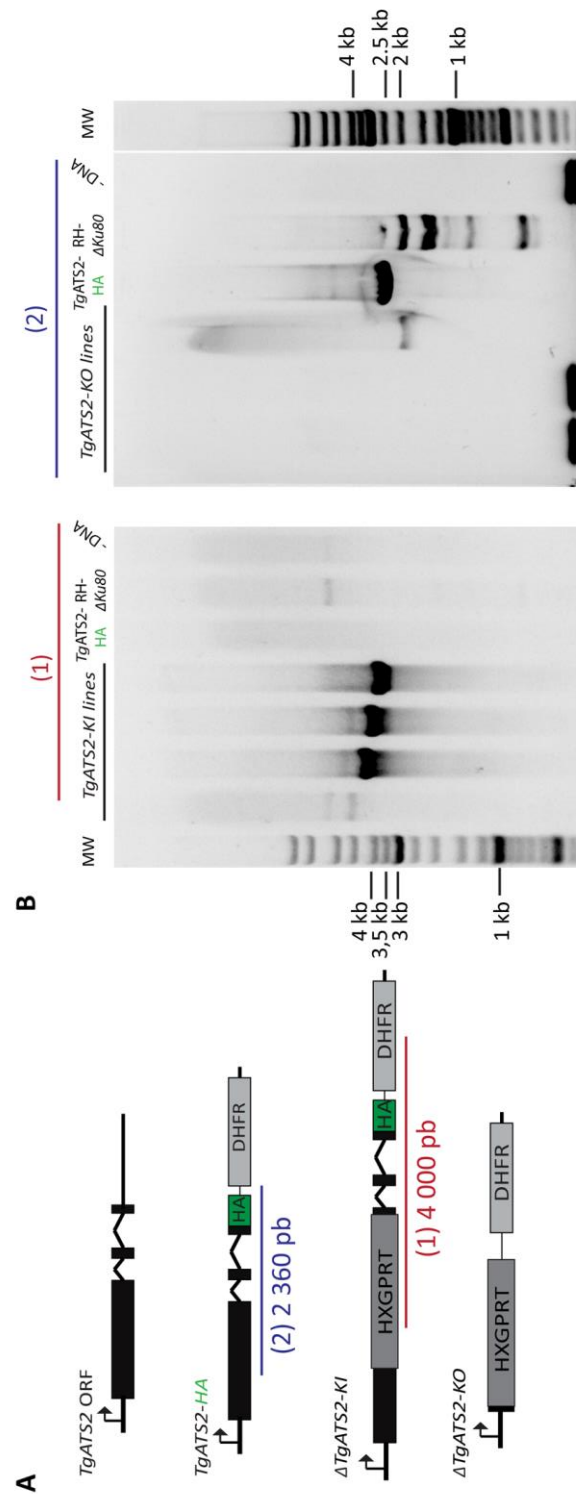


Figure S1: Isolation of stable Δ TgAST2 mutants that contain HXGPRT cassette within *TgAST2*. A) Scheme of PCR strategies to isolate a stable Δ TgAST2-KI and Δ TgAST2-KO. Fragment of 4000 pb (1) is only amplified in Δ TgAST2-KI mutants (left gel in B) but not

in RH- $\Delta ku80$. Whereas the fragment of 2360 pb (2) is only amplified in *TgATS2*-HA line but not in RH- $\Delta ku80$ and $\Delta TgATS2$ -KO (right gel in B).

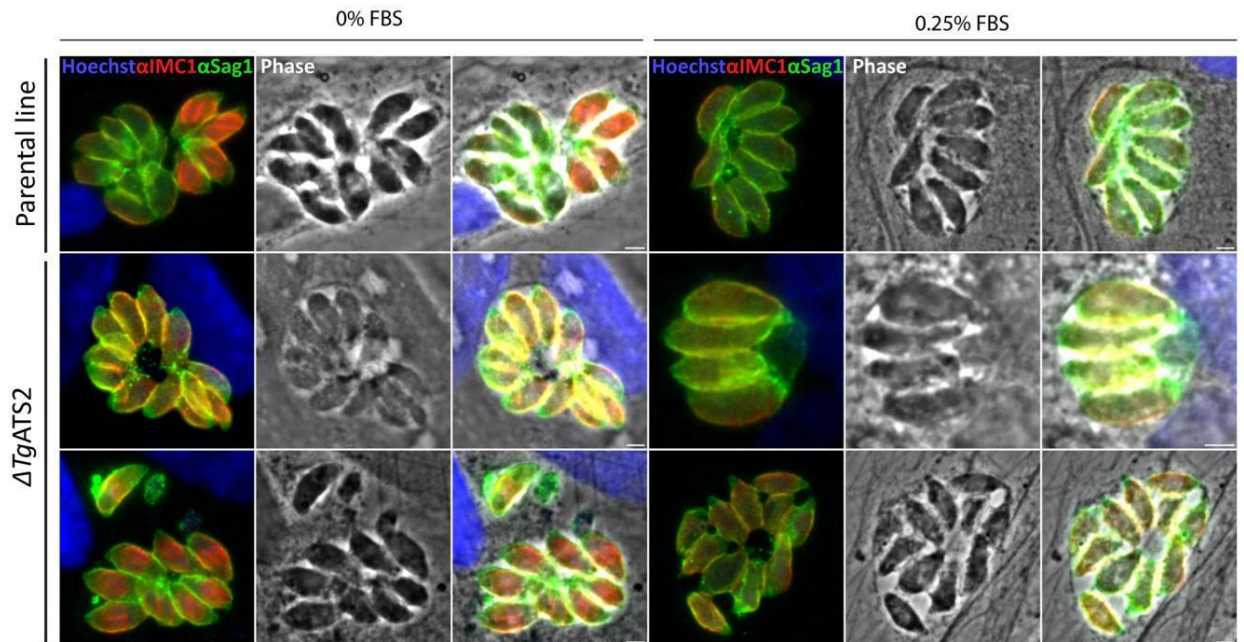


Figure S2: $\Delta TgATS2$ intracellular parasite seem not to be affected by FBS starvation. Immunofluorescence assay on parental line and $\Delta TgATS2$ grown 24 h in FBS starvation conditions 0% and 0.25%, using anti-IMC1/Alexa546 and anti-Sag1/Alexa488 antibodies. Scale bars=2 μ m

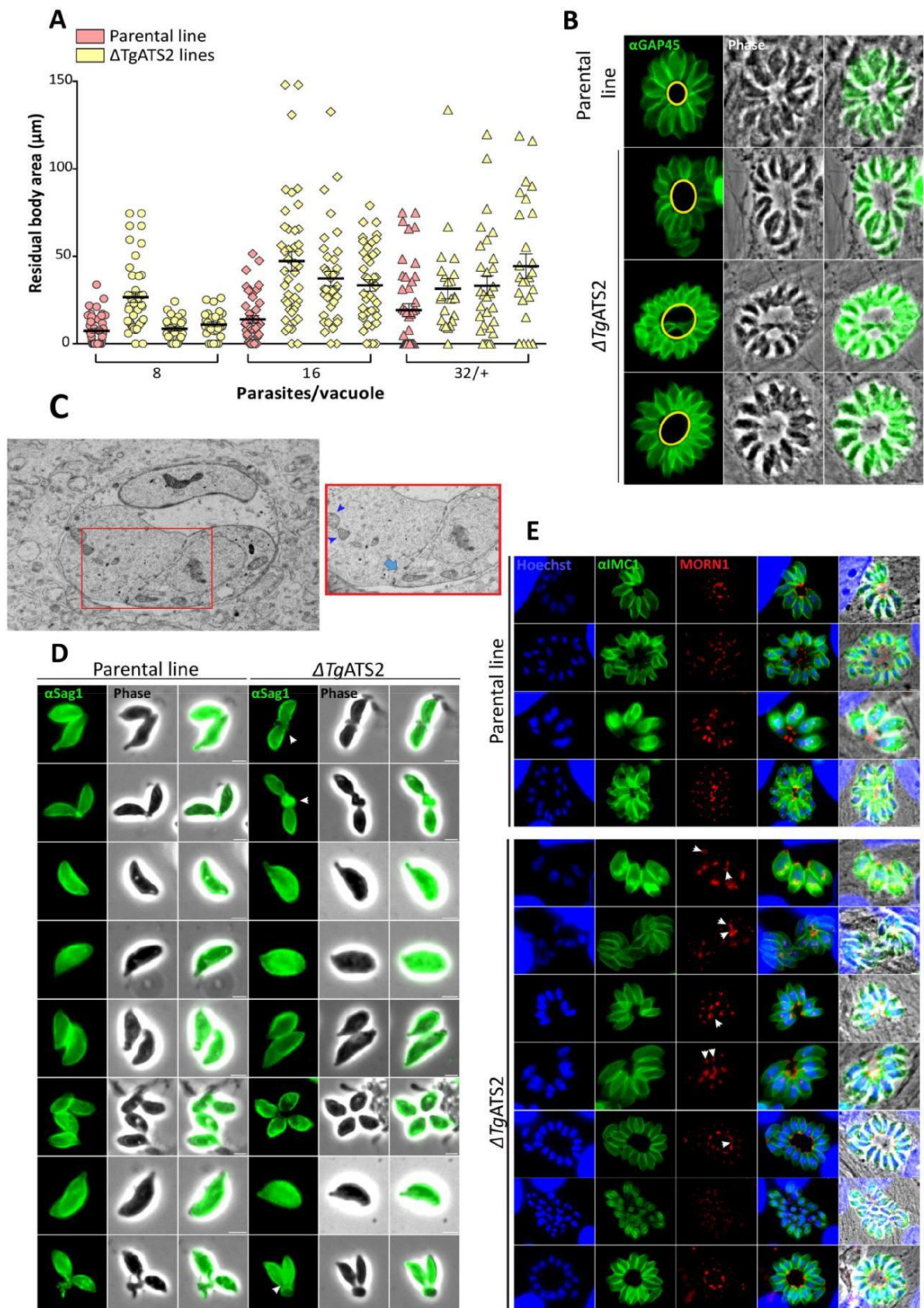


Figure S3: ΔTgATS2 mutants present a large “cytoplasmic bag” that keeps the new daughter cells attached to each other. A) Residual body area measurement as shown

in (B) panels using yellow circles to delimit the area from 100 vacuoles that contain 8 to 32 parasites/vacuole in parental line and three independent $\Delta TgATS2$ clones. C) Transmission electronic microscopy showed a large “cytoplasmic bag” that may contain mitochondrion cristae (blue arrowheads in insert) and immature pellicle at the basal pole (light blue arrow in insert) of intracellular tachyzoite. D) Immunofluorescence performed to investigate the structure of freshly egressed $\Delta TgATS2$ and parental tachyzoites using anti-Sag1 and Alexa488 antibodies. White arrowheads demonstrate a putative “cytoplasmic bag” already shown in (C). Transient expression of MORN1-RFP in $\Delta TgATS2$ and (E) immunofluorescence assays using anti-IMC1 and Alexa488 antibodies showed a correct ring structure of MORN1 in $\Delta TgATS2$ during and after cell division compared to parental parasites.

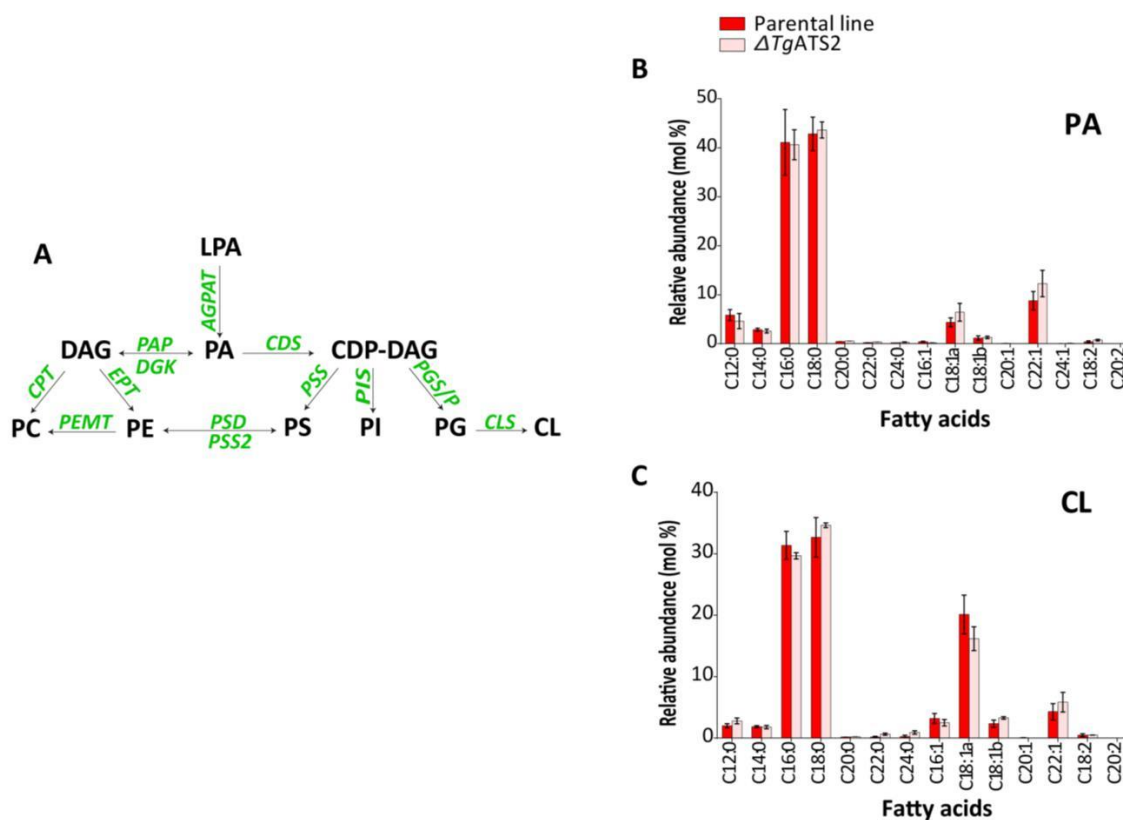


Figure S4: PA is the central precursor of bulk phospholipid synthesis. A) Scheme of PA and phospholipid synthesis via Kennedy (DAG) and CDP-DAG pathways. Analysis of the individual molecular species of PA (B) and CL (C).

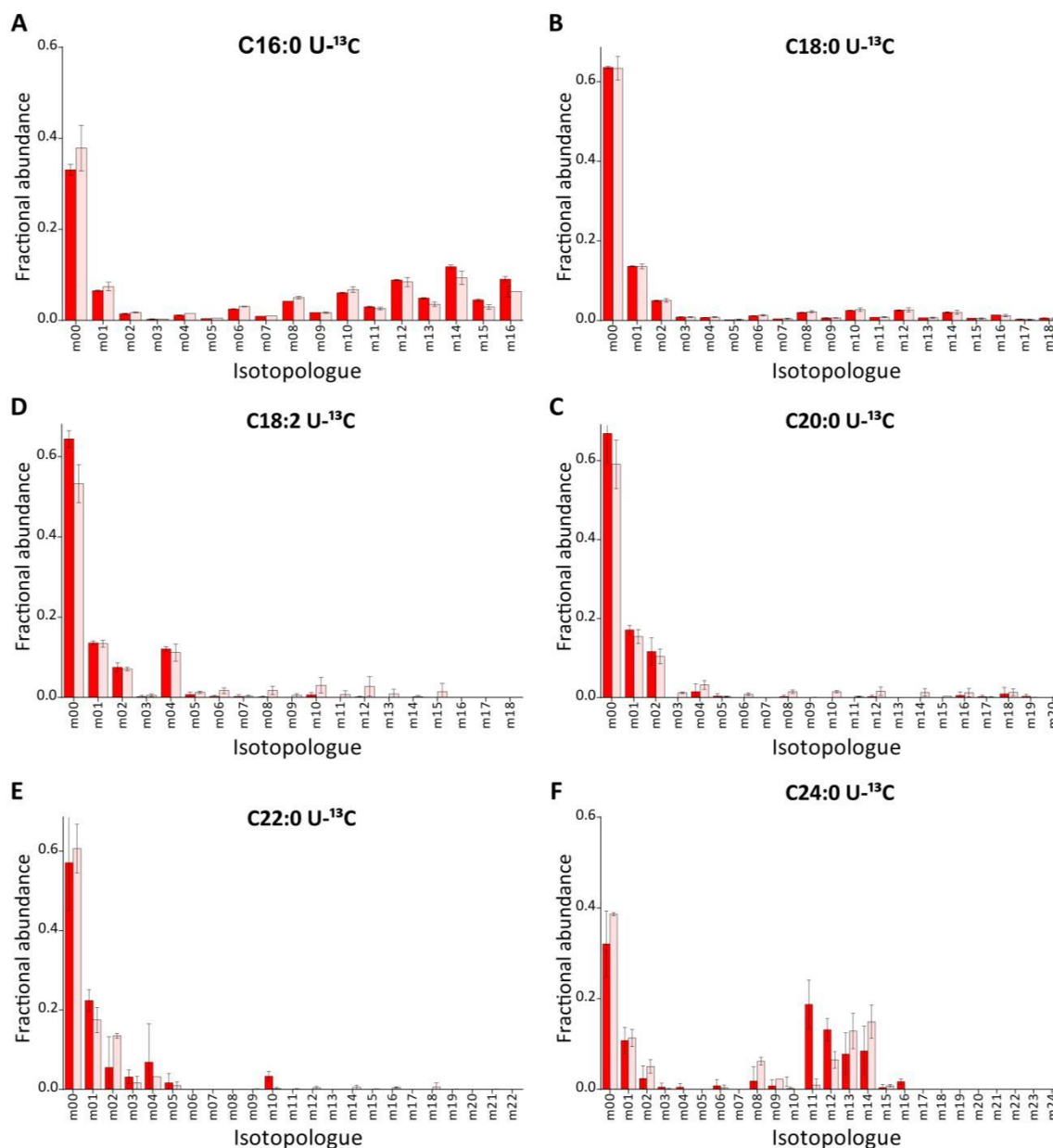


Figure S5: Analysis of *FASII* fatty acid biosynthesis and elongation in $\Delta TgATS2$ parasites using $U-^{13}C$ -glucose metabolic labelling. $\Delta TgATS2$ tachyzoites were labelled with $U-^{13}C$ -glucose for 72 h in normal condition. Lipids were extracted, derivatized to form fatty acid methyl esters (FAMES), and analysed by GC-MS to determine ^{13}C incorporation and mass isotopologue distributions (MID) in different fatty acid species FA (16:0) (A), (18:1) (B), (18:2) (C), (20:0) (D), (C22:0) (E) and (C24:0) (F).

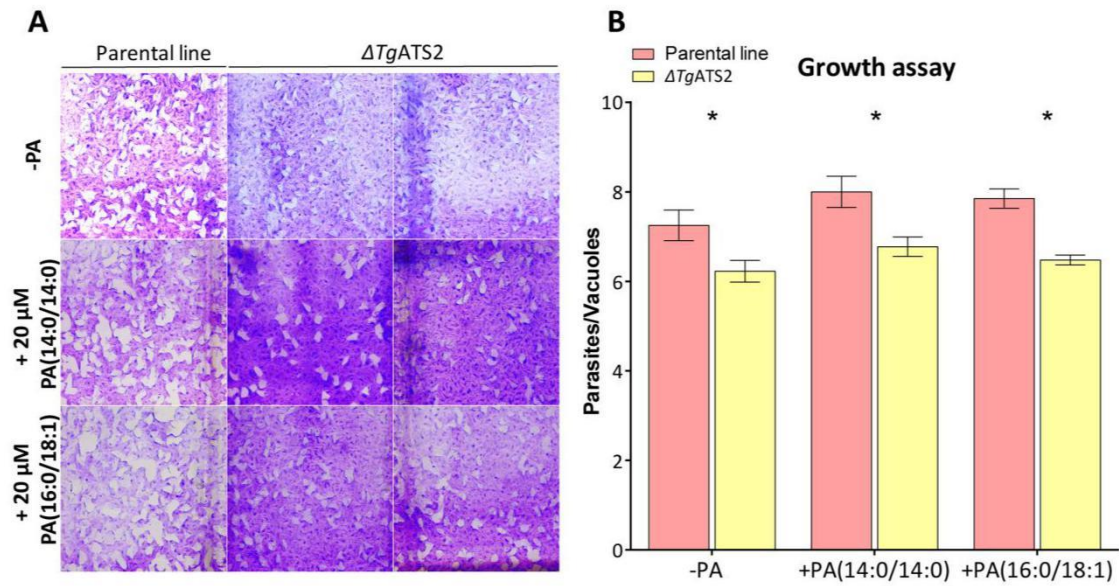


Figure S6: PA complementation improves growth but did not rescue growth defect in $\Delta TgATS2$. A) Plaque assay performed with the parental line and $\Delta TgATS2$ complemented with 20 μM of PA(14:0/14:0) or PA(16:0/18:1). B) Growth fitness analysis performed using semi-automated cell-based assay on infected cells with parental line and $\Delta TgATS2$ 30 h post-infection. Parasite numbers within vacuoles were counted to obtain the proliferative index which was evaluated by parasite/vacuole number ratio, in two independent $\Delta TgATS2$ lines conducted in triplicate. * *P* values of ≤ 0.05 were considered significant.

III- Informations supplémentaires

Génération du mutant inducible *TgAGPAT*

Matériels et méthodes

Constructions plasmidiques et transfection de *T. gondii*

Le mutant conditionnel *TgAGPAT-iKO* a été généré selon la stratégie décrite dans Striepen and Soldati (2007) et Sheiner *et al.* (2011). La région 5' de la séquence génomique de *TgAGPAT* correspondant à l'exon1 et l'intron1 du gène a été amplifiée en utilisant le couple d'amorces 5'-AGATCTCTCTCACGGTGGCAAGATGGCGT-3' et 5'-CCTAGGCCGGCAACAAACAAGGAACGCAGAT-3'. Le fragment de 755 pb a été digéré par les enzymes de restriction *BglII* et *AvrII* et inséré dans le plasmide contenant le promoteur inducible (pDt7s4H3, p : plasmide, D : cassette DHFR, t : tetO, s4 : promoteur Sag4, H3 : 3-HA) linéarisé avec les mêmes enzymes. La région 5'UTR du gène *TgAGPAT* a été amplifiée avec le couple d'amorces 5'-CATATGGGATCGTGAAGGTTTTGCCGACAAG-3' et 5'-CATATGGGGGCAAAGCGGAGGCTGGTCAAA-3'. Le fragment d'ADN obtenu de 1185 pb a été digéré avec l'enzyme de restriction *NdeI* et inséré dans le plasmide pDt7s4::*TgAGPAT*-H3 linéarisé avec la même enzyme au niveau de la région 5'UTR de la cassette DHFR. Les clones isolés contenant le vecteur pDt7s4::*TgAGPAT-iKO* sont linéarisés avec l'enzyme de restriction *XcmI* et 100 µg de plasmide ont été transfectés dans les tachyzoites (TATi- $\Delta Ku80$) fraîchement sortis de leurs cellules hôtes (Sheiner *et al.* 2011). L'électroporation a été réalisée dans des cuvettes 2 mm BTX ECM 630 (Harvard Apparatus) à 1,100 V, 25 Ω , et 25 μ F. Les parasites ont été sélectionnés grâce à la cassette DHFR qui leur confère la résistance à la pyriméthamine (1 μ M). L'intégration du promoteur dans le locus a été confirmée par PCR dans une population mixte. Ensuite, les clones résistants ont été isolés par une dilution limitée et criblés par PCR et Southern-blot.

Extraction d'ADN génomique et Southern-blot

L'intégration du promoteur inducible au locus *TgAGPAT* dans la lignée d'intérêt *TgAGPAT-iKO* a été analysée par Southern-blot. Le génome des souches *TgAGPAT-iKO* et RH- $\Delta ku80$ a été isolée à partir de parasites fraîchement sortis (10^7 parasite/ml). Les parasites sont filtrés, lavés au PBS et centrifugés 10 min à 2000 g. Le culot de parasites est ensuite suspendu dans un tampon ETDA et la lyse cellulaire est réalisée à

55°C pendant 1h avec 1% SDS, 10 µg RNase et 20 µg de protéinase K. Une extraction au phénol/chloroforme est réalisée pour éliminer toute contamination. 10 µg d'ADN génomique sont par la suite digérés par les enzymes de restriction *BglIII* ou *BclI/AvrII* toute la nuit à 37°C. Les fragments digérés sont séparés sur un gel d'agarose à 0.8%. Le transfert des fragments d'ADN est réalisé sur une membrane Hybond N+ (GE Healthcare) et le Southern-blot est alors réalisé en utilisant des sondes marquées DIG (kit d'amplification Roche) d'une longueur de 500 pb, spécifiques : i) à la région 5'UTR de *TgAGPAT* (Fig. 20a-b, sonde rouge), ii) de la cassette DHFR (Fig. 20a-b, sonde violette) et iii) de l'exon 3 de *TgAGPAT* (Fig. 20a-b, sonde bleu).

RT-PCR semi-quantitative

Afin de confirmer l'inhibition de l'expression de *TgAGPAT*-iKO par l'addition de l'anhydrotétracycline (ATc), une RT-PCR semi-quantitative a été réalisée. Les extraits ARN totaux sont obtenus à partir de trois cultures de parasites indépendantes en présence de 1 µg/ml d'ATc et en utilisant un kit d'extraction d'ARN (Machery Nagel). Les trois extraits correspondant à chacune des souches sont assemblés. Une rétro transcription est réalisée sur chacun des extraits d'ARN (100 ng) en triplicata, en utilisant des OligodT (Thermo OligodT₁₈) et une enzyme RT transcriptase SuperScript III (Invitrogen). Les conditions utilisées pour cette amplification sont conformes aux instructions définies par le fabricant. Les amplifications par PCR sont faites avec l'enzyme Taq Ozyme HS (Ozyme) à partir des dilutions de cDNA (1 :10, 1 :100 et 1 :1000). Les conditions de PCR sont : une première dénaturation à 94°C pendant 2 min, 28 cycles d'amplification constitués d'une phase de dénaturation de 94°C de 30 sec, une phase d'alignement à 59°C et 60 °C de 15 sec chacune et phase d'élongation à 72°C de 1 minute et finalement d'une élongation à 72°C pendant 3 min. Pour le fragment 1 (224 pb) le couple d'amorces utilisé est : 5'-CGTTTTCTTTCTGCTGGCCTTCCT-3' et 5'-TCGCGTGGTTGCACATGATGATG-3', pour le fragment 2 (366 pb), les amorces sont : 5'-CGAGGTGTTGGACTCCGGGA-3' et 5'-TAGAGACCGTGGCCTCGGTGG-3'. Une amplification de l'actine 1 (384 pb) sur la fraction de cDNA est réalisée comme control positif de la RT-PCR en utilisant les amorces : 5'-GCGCGACATCAAGGAGAAGC-3' et 5'-TACTTACGCTCAGGAGGAGCAACG-3'.

Résultats et discussion

Quand j'ai commencé mon étude doctorale, les données bio-informatiques sur la base de données ApiLoc (<http://apiloc.biochem.unimelb.edu.au/apiloc/apiloc>), suggéraient que *TgAGPAT* (TGME49_240860) serait plastidiale. L'analyse de la séquence en acides aminés prédisait la présence d'un signal peptide mais pas de transit peptide. Nous avons alors décidé d'insérer une étiquette HA en région C-terminal de la séquence du gène de *TgAGPAT* pour éviter une mis-localisation dans le réticulum endoplasmique éventuellement due au clivage du signal peptide. Cependant toutes les tentatives d'étiquetage en utilisant le plasmide pLIC-HA-DHFR ont abouties à l'absence d'un signal HA en immunofluorescence et en Western-blot. Toutefois, les parasites négatifs au signal-HA présentaient une forte résistance à la pyriméthamine. D'autres étiquettes ont été testées comme myc et Ty mais sans succès. Nous avons alors émis l'hypothèse que le marquage avec un épitope-HA en région N-terminal pouvait déstabiliser les modifications post-traductionnelles de *TgAGPAT* conduisant à la dégradation de la protéine. En effet, celle-ci possède un résidu Ser phosphorylé en position 275/281 acides aminés. Par ailleurs, aucun criblage par PCR n'a permis d'identifier des clones ayant intégré l'étiquette HA et la cassette de résistance au bon locus. De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que l'enzyme est peut être essentielle pour le développement intracellulaire de *T. gondii* et que les parasites exprimant une protéine *TgAGPAT* défectueuse sont létaux. Nous avons alors décidé de générer un mutant inductible à l'anhydrotétracycline (ATc) par un remplacement du promoteur endogène par un promoteur inductible tetO (Meissner *et al.*, 2002) comme décrit dans la Fig. 20a. J'ai alors, utilisé le plasmide pDt7s4H3 dans lequel j'ai inséré deux régions d'homologie correspondant à la région 5'UTR de *TgAGPAT* et à la région 5' de la séquence génomique de *TgAGPAT* contenant le codon ATG, respectivement de part et d'autre de la cassette DHFR et du promoteur tetO-Sag4 (Fig. 20a). Les clones résistants à la pyriméthamine ont été isolés et confirmés par Southern-blot (Fig. 20b). Le clone *TgAGPAT*-iKO-2 semble avoir intégré la cassette de résistance à la DHFR en amont du gène *TgAGPAT* contrairement au clone *TgAGPAT*-iKO-1 qui semble ne pas être isolé et présente les deux profils, sauvage et muté (Fig. 20b). Afin de confirmer la répression de l'expression de *TgAGPAT* par un traitement à l'ATc (1µg/ml) dans le milieu de culture, une RT-PCR semi-quantitative a été réalisée en utilisant deux couples d'amorces spécifiques à la séquence codante (CDS) *TgAGPAT* (Fig. 20c). Cette analyse

permet de visualiser sur un gel d'agarose la réduction de la transcription du gène *TgAGPAT* par le traitement d'ATc qui se traduit par une diminution de la quantité relative de son ARNm dans la fraction des ARN totaux. Ainsi, j'ai pu constater que l'expression de *TgAGPAT* dans deux clones différents *TgAGPAT*-iKO n'est pas affectée par l'addition de l'ATc (Fig. 20d). En effet, en comparant le J-1 et le J-4 de chacun des mutants inductibles *TgAGPAT*-iKO et la souche parentale TATi- $\Delta ku80$, il n'y a pas de différence. L'amplification d'une région de la séquence codante pour l'actine 1 (ACT1) est un control positif permettant de visualiser la diminution de la quantité relative de l'amplicon en fonction à la dilution de la banque cDNA et non pas affectée avec le traitement ATc (Fig. 20d). Ces résultats suggèrent que l'expression de *TgAGPAT* n'est pas contrôlée par le promoteur tetO et l'ATc ne réprime pas son expression. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat dont la première serait une intégration non spécifique du promoteur inductible et de la cassette de résistance.

L'analyse de la séquence nucléique de *TgAGPAT* et de la région 5'UTR par un BLAST dans la base de données ToxoDB, n'a pas révélé la présence d'une autre région génomique qui présente un fort taux d'homologie avec les deux séquences utilisées comme régions d'homologie. J'ai alors examiné la présence de site d'épissage alternatif, un autre codon ATG ou encore un autre promoteur que celui prédit. L'analyse par le logiciel en ligne NetPlantGene (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPGene/>) n'a pas révélé la présence d'un éventuel site d'épissage alternative dans le cadre de lecture. Cependant, l'analyse de la présence d'un autre codon ATG a révélé la présence de six autres codons dans le même cadre de lecture et en amont du site catalytique. Ceci peut éventuellement suggérer la présence d'un autre promoteur en amont de l'un de ces six codons ATG. L'analyse de la séquence codante *TgAGPAT* en amont du site catalytique avec le programme en ligne SoftBerry BPROM (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom>) ne suggère pas la présence d'un autre promoteur possible dans les exons 1 et 2 en amont du site catalytique. Cette analyse a été réalisée précédemment sur un gène de *T. gondii* qui a permis l'identification d'un promoteur procaryote fonctionnel dans l'exon 1 du gène codant pour une choline kinase (Sampels *et al.*, 2012). Cependant, ceci n'est pas le cas de *TgAGPAT*. On a alors émis l'hypothèse que la modification de la séquence génomique de *TgAGPAT* peut être létale pour le parasite ce qui peut éventuellement témoigner de l'importance vitale de cette enzyme pour le parasite.

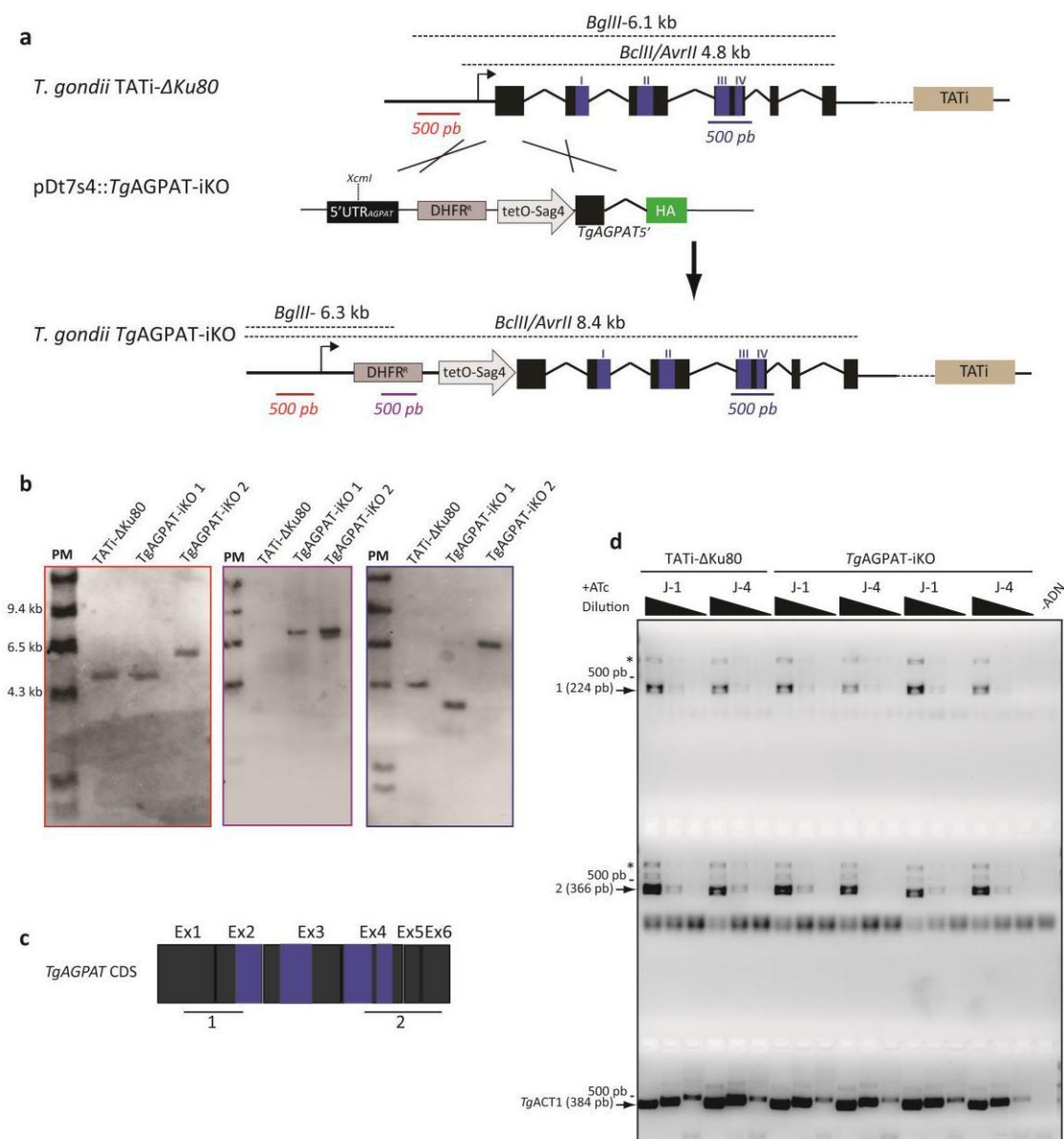


Figure 20 : Stratégie de génération du mutant inductible *TgAGPAT-iKO*. a) Schéma représentant la stratégie de recombinaison homologue pour l'insertion d'un promoteur inductible tetOSag4 en amont de la séquence génomique *TgAGPAT* afin de générer un mutant inductible *TgAGPAT-iKO* résistant à la DHFR. b) Analyse par Southern-blot pour confirmer l'insertion du promoteur inductible par recombinaison homologue au locus cible. PM : poids moléculaires ; kb : kilo bases. Les différentes sondes utilisées sont représentées en rouge, violet et bleu et les gels correspondant à chacune des sondes sont entourés de la couleur correspondante. c) stratégie de criblage par RT-PCR semi-quantitative de l'inhibition du promoteur tetOSag4 en présence de 1 μ g/ml d'ATc. 1 et 2 représentent les régions amplifiées par RT-PCR semi-quantitative. Les ARN totaux des parasites cultivés en présence d'ATc 24 h (J-1) ou quatre jours (J-4) sont extraits et rétro transcrits par un OligodT (d).* : amplification correspond aux fragments génomiques. Pb : paire de bases. *TgACT1* : control positif de la RT-PCR semi-quantitative sur l'ADNc de l'actine 1.

A l'issue de cette étude, il n'a malheureusement pas été possible de caractériser le phénotype d'un mutant inductible de *TgAGPAT* et la compréhension de son implication dans la synthèse de lipides membranaires de *T. gondii*. Cependant, le mutant stable CRISPR pour *TgAGPAT* (voir article plus haut) ne présentait pas de défauts morphologiques en immunofluorescence. Toutefois, cette analyse a été réalisée 48 h post-transfection. Il faudra essayer de générer des mutants stables et les isolés immédiatement après la transfection pour l'obtention de clones indépendants. En effet, au laboratoire, on ne dispose pas d'un anticorps anti-AGPAT et l'incapacité d'étiqueter la protéine peuvent être des facteurs limitants pour sélectionner des mutants isolés à partir d'une population mixte surtout s'ils présentent un défaut de croissance quelconque. Par ailleurs, il serait aussi intéressant de refaire une tentative d'étiquetage de la protéine en région C-terminal ou N-terminal, maintenant que l'enzyme a été localisée dans le réticulum endoplasmique, peut être en utilisant le système CRISPR-Cas9 (Sidik *et al.*, 2014). Cette étude permettra de compléter notre compréhension sur la collaboration entre la voie procaryote de synthèse des précurseurs lipidiques dans l'apicoplaste et son homologue eucaryote dans le réticulum endoplasmique.

Discussion générale et Conclusions

L'identification et l'étude de la voie *FASII* chez les *Apicomplexa* ont contribué à la compréhension du métabolisme des acides gras et les dérivés lipidiques dans ces parasites. Chez *T. gondii*, cette voie est essentielle pour la survie et le développement intracellulaire du parasite. Chez *Plasmodium spp.* Les besoins en acides gras synthétisés *de novo* par *FASII* semblent différer entre les espèces *Plasmodium*. Toutefois, ces parasites durant leur stade de division massive, requièrent l'activité de *FASII* pour leur survie. De plus, les acides gras de *FASII* peuvent être transportés vers le réticulum endoplasmique pour des étapes d'élongations et de désaturations. Cependant, à ce jour, les mécanismes d'incorporation de cet ensemble d'acides gras en plus de ceux importés de la cellule hôte restent mal connus.

Dans cette étude, nous avons pour objectif d'apporter des informations supplémentaires pour contribuer à la compréhension du métabolisme lipidique chez *T. gondii*. Ainsi, nous nous sommes intéressés à la synthèse des précurseurs centraux reliant la voie *FASII* à la synthèse de tous les phospholipides. Cette voie de synthèse des précurseurs lipidiques : l'acide lysophosphatidique (LPA) et l'acide phosphatidique (PA), nécessite l'activité de deux enzymes acyltransférases, ATS1 et ATS2 respectivement. Ces enzymes ont été prédites chez *T. gondii* au niveau de l'apicoplaste. En vue de la localisation prédite, nous avons supposé que cette voie est de type « procaryote ». Etant donné que le LPA et le PA sont assemblés des acides gras synthétisés *de novo*, on peut croire que cette nouvelle voie plastidiale est nécessaire pour le parasite tout comme la voie *FASII*. Afin de tester nos hypothèses, les objectifs de mon doctorat étaient de confirmer la localisation de cette voie dans l'apicoplaste de *T. gondii* et d'analyser les phénotypes des mutants nuls ou inductibles pour cette voie de synthèse du PA.

L'apicoplaste, a-t-il conservé la voie procaryote de synthèse de l'acide phosphatidique décrite chez les bactéries et le chloroplaste des plantes et des algues ?

Les analyses *in situ* renforçaient nos prédictions concernant l'origine des enzymes *TgATS1* et *TgATS2*. Elles sont phylogénétiquement très proches des enzymes décrites dans les bactéries et le chloroplaste. Elles sont éloignées des enzymes eucaryotes dans le réticulum endoplasmique mais aussi de l'enzyme annotée chez *Cryptosporidium*

parvum. Ce parasite *Apicomplexa* est dépourvu d'apicoplaste et donc ne possède pas les fonctions plastidiales. De ce fait, la formation de deux groupes d'enzymes très distincts nous a encouragés à approfondir l'étude sur ces deux enzymes et leur rôle dans *T. gondii*.

La première étape de mon doctorat consistait à confirmer la localisation de la voie de synthèse du PA à partir des acides gras dans l'apicoplaste. Les analyses par immunofluorescence sur des souches qui expriment des enzymes étiquetées ATS1-HA et ATS2-HA a permis de confirmer leur localisation dans l'apicoplaste. Il m'a été aussi possible de confirmer l'activité sn-acylglycérol 3-phosphate acyltransférase de *TgATS2* dans la souche mutant *E. coli* SM2-1 mutante pour cette activité. Toutefois, *TgATS1* n'était pas fonctionnelle dans la bactérie BB-26. Cependant, ce résultat ne peut pas exclure l'activité acyltransférase de *TgATS1*. Afin de tester cette hypothèse, il faudra réaliser un test d'activité et d'affinité avec différents substrats, à partir d'un extrait bactérien exprimant une protéine ATS1 recombinante. Néanmoins, Toujours est-il, l'apicoplaste semble avoir conservé la voie de synthèse de l'acide phosphatidique, un héritage de la cyanobactérie ancestrale. *T. gondii* n'est pas le seul *Apicomplexa* ayant conservé cette voie, chez *Plasmodium spp*, la synthèse du LPA a été confirmée dans l'apicoplaste (Lindner *et al.*, 2014 ; Shears *et al.*, 2016). Cependant, aucune étude à ce jour, n'a identifié la synthèse du PA dans l'apicoplaste de *Plasmodium*.

Les acides gras issus de FASII entrent dans la composition de quelles classes lipidiques et quelle est l'implication de l'apicoplaste dans ce processus ?

Lors de mon doctorat, il m'a aussi été possible d'identifier les espèces lipidiques directement concernées par l'activité de *TgATS1* et de *TgATS2*. En effet, les deux enzymes ont une importante affinité pour les acides gras issus de la voie *FASII*. Un marquage avec un isotope stable le ^{13}C a révélé une importante baisse du marquage et de l'abondance du produit principale de *FASII*, le C14:0 et ses dérivés élongés, dans le mutant inductible *TgATS1-iKO* et le mutant stable $\Delta TgATS2$ (Ramakrishnan *et al.*, 2012, Amiar *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'analyse lipidique a révélé une réduction très conséquente de l'abondance relative des phospholipides majeurs dans le parasite, à savoir, la PC, la PI et la PE chez le mutant *TgATS1-iKO*. Ceci se traduit par arrêt de la ségrégation/biogénèse de l'apicoplaste et un arrêt de la croissance du parasite. Le mutant $\Delta TgATS2$ survie à la mutation malgré un ralentissement de la

croissance/division. De ce fait, je l'ai considéré comme un outil pour mieux comprendre le rôle de cette voie de synthèse du PA chez *T. gondii*. Le mutant ATS2 ne présentait pas de réduction dans l'abondance relative des classes de PLs majeurs par contre leur composition en acides gras est différente chez le mutant en comparaison avec la souche parentale. Néanmoins, un résultat a suscité notre attention et concerne la redistribution des acides constituant chacun des PLs qui peut altérer l'homéostasie lipidique des membranes du parasite mutant. Par ailleurs, le mutant *TgATS2* est principalement affecté dans la synthèse du PG qui très faiblement abondant dans le mutant en comparaison avec la souche parentale. Toutes ces modifications de la composition en acides gras et des phospholipides majoritairement retrouvés dans les membranes peuvent expliquer le ralentissement de croissance du mutant. Des changements similaires dans les membranes bactériennes ou végétales affectent la fluidité des membrane et leur tolérance aux stress tel que le froid (Wada *et al.*, 1990 ; Sinensky, 1973; Wolter *et al.*, 1992; Nishida and Murata, 1996; Wu and Browse, 1996 ; Los and Murata, 2004; Holtuis and Menon, 2014). La composition lipidique spécifique des membranes biologiques dite « l'homéostasie lipidique » définit la fonction et la dynamique de chacune des membranes. Par exemple, la membrane interne des mitochondries est riche en PG et CL pour favoriser la stabilisation des fonctions métaboliques dans la mitochondrie. Ainsi, ce changement de la composition en acide gras des différentes classes de PLs peut affecter les fonctions et surtout la dynamique membranaire qui consiste en la courbure membranaire, la fluidité, la fission, la scission et l'interaction avec les protéines effectrices au niveau des membranes.

A l'issue de ce travail, je suggère un rôle très important de l'apicoplaste dans la synthèse des phospholipides membranaires. D'une part, le LPA est utilisé pour la synthèse de tous les phospholipides et son activité semble être unique dans le parasite, bien que la croissance des parasites mutés peut être compensée partiellement par la complémentation au LPA(14:0) exogène. D'autre part, le PA est l'intermédiaire pour l'incorporation des acides gras néo synthétisé *do novo* via *FASII* pour les intégrer dans les membranes. Néanmoins cette voie ne semble pas être unique dans le parasite et elle est compensée par une autre voie de synthèse du PA. Cette seconde voie n'est pas redondante avec celle de l'apicoplaste car elle compense avec d'autres espèces d'acides gras retrouvés dans la fraction lipidique analysée depuis les mutant $\Delta TgATS2$.

Existe-il d'autres voies de synthèse de l'acide phosphatidique dans le parasite ?

En effet, il semble que *T. gondii* comporte une autre voie de synthèse du PA que j'ai pu localiser dans une structure péri-nucléaire, probablement le réticulum endoplasmique. Malheureusement, je n'ai pas pu caractériser plus en détails le mutant stable CRISPR de *TgAGPAT* ni étudier l'impact de la mutation sur la synthèse des lipides chez *T. gondii*. Cette analyse pourra fournir plus d'informations sur le flux lipidique chez *T. gondii* principalement entre l'apicoplaste et l'ensemble des compartiments membranaires du parasite. Cependant, un double mutant $\Delta TgATS2/\Delta TgAGPAT$ présente un défaut de ségrégation de l'apicoplaste. Ceci est complètement cohérent avec le résultat obtenu avec le mutant inductible *TgATS1-iKO*. Ceci indique que les deux voies de synthèse du PA ont évolué de manière à collaborer ensemble dans la synthèse des phospholipides majeurs à partir –peut-être- d'un précurseur unique, le LPA formé dans l'apicoplaste *via* *TgATS1*.

En conclusion, cette étude permet de lever le voile sur l'une des voie importante que *T. gondii* a hérité dans l'apicoplaste et qu'il a conservé de manière bénéfique, tout au long de l'évolution. En effet, on a pu mettre en évidence, un flux lipidique très important depuis l'apicoplaste vers les différents compartiments membranaires du parasite. Il est quand même requis de bien analyser le phénotype du simple mutant $\Delta TgAGPAT$ et le double mutant $\Delta TgATS2/\Delta TgAGPAT$ et peut être même générer d'autres mutants sur un fond génétique affecté pour l'une des voies d'élongation, par exemple. Il est aussi possible que l'étude de la voie de synthèse du PG et des CL peut apporter des informations supplémentaires sur le flux lipidique entre l'apicoplaste et la mitochondrie. Ce flux pourrait-il avoir un rôle dans la liaison très étroite entre l'apicoplaste et la mitochondrie ? Ceci peut être nécessaire pour améliorer et mieux comprendre encore les fonctions biologiques exactes de ces voies procaryotes que *T. gondii* conserve précieusement et peuvent-elles être considérées comme de bonnes cibles pour les traitements thérapeutiques ?

Annexes

**Evolution of galactoglycerolipid
biosynthetic pathways – From
cyanobacteria to primary plastids and
from primary to secondary plastids**

Revue scientifique



Review

Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways – From cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids

Dimitris Petroustos^a, Souad Amiar^b, Heni Abida^c, Lina-Juana Dolch^a, Olivier Bastien^a, Fabrice Rébeillé^a, Juliette Jouhet^a, Denis Falconet^a, Maryse A. Block^a, Geoffrey I. McFadden^d, Chris Bowler^c, Cyrille Botté^b, Eric Maréchal^{a,†}

^a Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, CNRS, CEA, INRA, Univ. Grenoble Alpes, UMR 5168, Institut de Recherches en Sciences et Technologies pour le Vivant, CEA Grenoble, F-38054 Grenoble, France

^b ApicoLipid Group, Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes, CNRS, Univ. Grenoble Alpes, UMR 5163, Institut Jean Roget, F-38042 Grenoble, France

^c Environmental and Evolutionary Genomics Section, Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure, CNRS UMR 8197, INSERM U1024, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris, France ^d Plant Cell Biology Research Centre, School of Botany, University of Melbourne, Victoria 3010, Australia

article info

Article history:

Received 24 October 2013

Received in revised form 19 February 2014

Accepted 20 February 2014

Available online 2 March 2014

Keywords:

Galactolipids

Monogalactosyldiacylglycerol

Digalactosyldiacylglycerol

Secondary endosymbiosis

Plastid

Chloroplast

abstract

Photosynthetic membranes have a unique lipid composition that has been remarkably well conserved from cyanobacteria to chloroplasts. These membranes are characterized by a very high content in galac-toglycerolipids, i.e., mono- and digalactosyldiacylglycerol (MGDG and DGDG, respectively). Galactoglyc-erolipids make up the bulk of the lipid matrix in which photosynthetic complexes are embedded. They are also known to fulfill specific functions, such as stabilizing photosystems, being a source of polyunsat-urated fatty acids for various purposes and, in some eukaryotes, being exported to other subcellular com-partments. The conservation of MGDG and DGDG suggests that selection pressures might have conserved the enzymes involved in their biosynthesis, but this does not appear to be the case. Important evolution-ary transitions comprise primary endosymbiosis (from a symbiotic cyanobacterium to a primary chloro-plast) and secondary endosymbiosis (from a symbiotic unicellular algal eukaryote to a secondary plastid). In this review, we compare biosynthetic pathways based on available molecular and biochemical data, highlighting enzymatic reactions that have been conserved and others that have diverged or been lost, as well as the emergence of parallel and alternative biosynthetic systems originating from other meta-bolic pathways. Questions for future research are highlighted.

2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	69
1.1. Galactoglycerolipids are a landmark of oxygen-evolving photosynthetic organisms	69
1.2. How has galactoglycerolipid metabolism evolved in photosynthetic organisms, following primary and secondary endosymbioses?	70
2. Biosynthesis of galactoglycerolipids in cyanobacteria	72
2.1. Enzymes synthesizing MGlcDG	72
2.2. Epimerases converting MGlcDG into MGDG	73
2.3. Enzymes synthesizing DGDG	74
3. From cyanobacteria to primary plastids: emergence of a new galactolipid synthetic pathway	74
3.1. Diacyl-precursors for MGDG and DGDG synthesis	74
3.1.1. Neosynthesis of C18/C16 phosphatidic acid and diacylglycerol in the stroma of chloroplasts (prokaryotic pathway)	74
3.1.2. Import of extraplastidial C18/C18 and C16/C18 diacyl-precursors (eukaryotic pathway)	75
3.1.3. Import of extraplastidial x3/x6 very-long chain polyunsaturated acyl precursors (omega pathway)	75

† Corresponding author. Tel.: +33 438784985. E-mail address: eric.marechal@cea.fr (E. Maréchal).

3.1.4. Evolution of plastidial and extra-plastidial pathways synthesis in primary endosymbionts	76	3.2. Evolution of galactoglycerolipid MGDs	76
76 3.2.1. MGDs	76	3.2.2. Cyanobacterial-type <i>dgdA</i> in Cyanidiales, a subdivision of Rhodophyta	79
78 3.2.3. DGDs in all other primary endosymbionts (Rhodophyta, Glaucophyta, Chlorophyta and Plants)	79		
4. From primary plastids to secondary plastids	79	4.1. The puzzling question of the lipidome of secondary plastids	79
79 4.2. Multiple possible systems to synthesize fatty acids <i>de novo</i> in the stroma and the cytosol	79	4.3. The conservation of the omega pathway	80
80 4.4. Mapping galactolipid-synthesizing enzymes in the multiple membranes that delimit secondary plastids	81	4.5. Origin of MGDs and DGDs in Chromalveolates	81
81 4.6. Loss of galactolipids in the secondary plastid of Apicomplexa	81		
5. Conclusion and perspectives	82	Acknowledgements	82
		Appendix A. Supplementary data	82
		References	82

1. Introduction

1.1. Galactoglycerolipids are a landmark of oxygen-evolving photosynthetic organisms

Photosynthetic eukaryotes (algae, plants and some protists) are characterized by the presence of a chlorophyll-containing organelle, the chloroplast, whose origin dates back to a primary endo-symbiotic event, when an ancestral cyanobacterium was engulfed within or invaded a primary eukaryotic host (for review, [1–8]). The membrane architecture of cyanobacteria and primary chloroplasts are similar: both are delimited by a two-membrane envelope and contain flattened membrane sacs, or thylakoids, in which the photosynthetic complexes are embedded. These membranes have a lipid composition, which has been remarkably well conserved through evolution. In particular, they are characterized by a very high content in galactoglycerolipids, i.e., mono- and digalactosyldiacylglycerol (MGDG and DGDG, respectively). The anomery of the terminal galactosyl groups differs in these two lipids: in MGDG, the galactose is in β conformation, forming the 1,2-diacyl-3-O-(β -D-galactopyranosyl)-sn-glycerol structure, whereas in DGDG, the second galactose is in α conformation, forming 1,2-diacyl-3-O-(α -D-galactopyranosyl)-(1 β 6)-O- β -D-galactopyranosyl)-sn-glycerol [9,10] (Fig. 1). In this review, we shall refer to these structures as β MGDG and α DGDG. The transfer of galactose from one galactolipid to another, which occurs in Angiosperms during certain environmental stresses including exposure to ozone or cold, and leading to the production of bb DGDG, bbb triGDG and bbbb tetraGDG [11,12] shall not be discussed here.

MGDG and DGDG were first isolated from the benzene extract of wheat flour (*Triticum aestivum*) by Carter et al. in 1956 [9]. The systematic inventory of lipids in photosynthetic organisms was initiated a decade later, taking advantage of the thin-layer chromatography separation methods developed by Nichols in 1963 [13] and Allen et al. in 1966 [14]. The ubiquity of galactolipids in all photosynthetic organisms emerged as they were discovered successively in cyanobacteria, e.g., *Anacystis nidulans* and *Anabaena variabilis* [15], various green algae, firstly *Chlorella vulgaris*

[16,17] and then *Chlamydomonas reinhardtii* [18,19], various embryophyta (plants), e.g., the moss *Hypnum cupressiforme* [20], the fern *Adiantum capillus-veneris* [21], the gymnosperm *Pinus sylvestris* [22] and the angiosperm *Spinacia oleracea* [23], and eventually to various photosynthetic protists deriving from green algae, such as *Euglena gracilis* [24] or deriving from red algae, such as the diatom *Phaeodactylum tricornutum* [25]. The presence of MGDG and DGDG was recognized as a hallmark of all

oxygen-evolving photosynthetic organisms [10], and consequently as the most abundant lipid classes on Earth [26]. Analytical technologies (mass spectrometry, NMR) have increased in sensitivity and throughput the last 15 years. Lipidomic

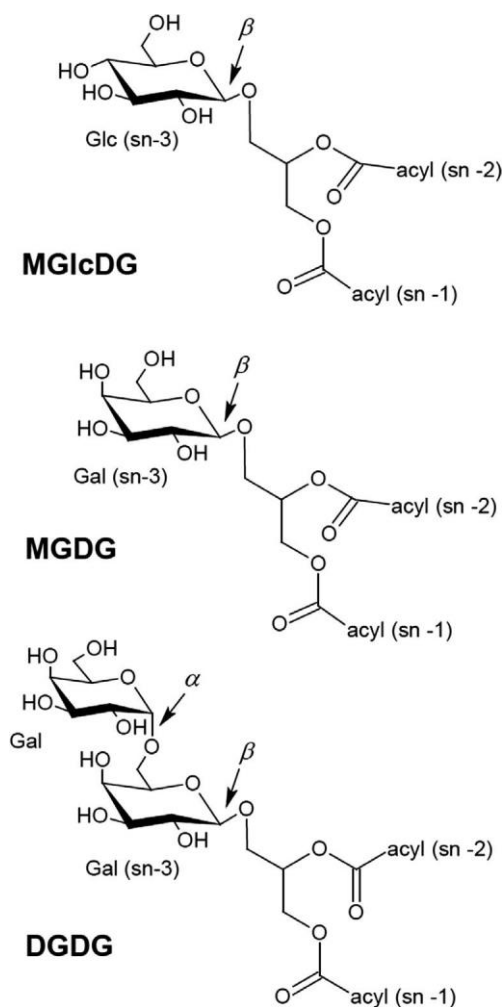


Fig. 1. Galactoglycerolipids conserved in photosynthetic membranes from cyanobacteria to primary chloroplasts of algae and plants. Positions sn-1 and sn-2 of the glycerol backbone are esterified to fatty acids and position sn-3 harbors the polar head. The α and β anomery are indicated. The precursor of galactolipids in cyanobacteria, MGlcDG, is also shown. MGlcDG, monoglucosyldiacylglycerol; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; DGDG, digalactosyldiacylglycerol.

characterization of numerous photosynthetic microorganisms in a large variety of genetic backgrounds, growth conditions and stresses have been made available [27] and provide precious information to start reconstructing the evolution of glycerolipid metabolism.

Together with phosphatidylglycerol (PG) and sulfoquinovosyl-diacylglycerol (SQDG), MGDG and DGDG make up the lipid matrix hosting the photosystems [29]. Besides their role as a membrane component, galactoglycerolipids are also known to fulfill specific molecular functions. They stabilize photosystem subunits [29,30], bind to the plastid protein import machinery [31], are a source of polyunsaturated fatty acids for various purposes and, in some eukaryotes like plants, DGDG was furthermore shown to be exported to extra-plastidial membrane compartments [32–34], where it could substitute for phosphoglycerolipids [32,35–37]. These roles shall not be detailed here and the reader is invited to refer to some recent reviews [12,28,29].

Considering the ubiquity of MGDG and DGDG, one might expect that the enzymes involved in their biosynthesis have been conserved through evolution. Surprisingly, this is not the case: the biosynthetic machinery producing MGDG and DGDG in eukaryotes has strongly diverged from that found in extant cyanobacteria.

Here, we summarize the evolution of galactolipid metabolism beginning with the cyanobacteria, although this was not the first system to be elucidated. Indeed, genes coding for galactolipid synthesis enzymes were initially characterized in angiosperms by Shimojima et al. in 1997 [38] and Dörman et al. in 1999 [39]. Subsequently, other organisms were explored based on sequence similarity. Frustratingly, bioinformatic searches for galactolipid orthologs of plant genes in cyanobacteria provided no candidates, and their identification was eventually achieved by Awai et al. in 2006 [40] and 2007 [41] and by Sakurai et al. in 2007 [42] through more classical means. We shall therefore describe the evolution of these pathways, regardless of the timeline of scientific discovery.

1.2. How has galactoglycerolipid metabolism evolved in photosynthetic organisms, following primary and secondary endosymbioses?

The question of the evolution of galactoglycerolipid metabolism has to be formulated in the context of photosynthetic eukaryote evolution, which is characterized by dramatic transitions in subcellular architecture. Important evolutionary transitions comprise primary and secondary endosymbiotic events, from an ancestral cyanobacterium to a primary chloroplast (Fig. 2A), and then from a symbiotic unicellular alga to a secondary plastid (Fig. 2B), respectively (for reviews, [1–7]).

If we first consider the simplest situation observed in plants and algae (the Archaeplastida kingdom, Fig. 2A), cells contain “simple plastids” and molecular evidence supports the view that all these plastids trace back to a single event of endosymbiosis [1]. An envelope comprising two membranes (the inner envelope membrane, IEM, and the outer envelope membrane, OEM) delineates the chloroplasts and derives from the two limiting membranes of the Gram-negative cyanobacterial ancestor. Based on photosynthetic pigments, storage material and cell walls, three lineages of these primary plastid bearing eukaryotes have diverged: a blue lineage (Glaucophyta), a red lineage (Rhodophyta), and a green lineage (green algae and plants) (Fig. 2A). In the “blue lineage”, in which chlorophyll a is associated to phycocyanin and allophycocyanin, there is a small group of unicellular organisms (Glaucophyta), including *Cyanophora paradoxa*, in which the chloroplast still contains a peptidoglycan cell wall between the inner and outer envelopes. The “red lineage”, in which chlorophyll a is energetically coupled to phycobilin, includes the red algae or Rhodophyta, such as *Cyanidioschyzon merolae*. Lastly, the “green lineage”, in which

chlorophyll a is associated to chlorophyll b, contains green algae or Chlorophyta, such as *C. reinhardtii*, and plants, or Streptophyta, such as *Arabidopsis thaliana*.

Recently it has emerged that the primary endosymbiotic creation of plastids was not a unique event. Reduced endosymbiotic cyanobacteria within cells of the amoeba *Paulinella* (in the Rhizaria taxon) are now recognized as a second, independent origin of plastids [43]. This organelle, also called the chromatophore, is therefore derived from a cyanobacterium, but is not ontogenetically related to chloroplasts found in all other species examined to date.

It is more difficult to understand how unicellular organisms may contain plastids limited by more than two membranes. Fig. 2B gives some examples of reasonable scenarios (adapted from [1]). Protists originating from a secondary endosymbiosis belong to at least three lineages: two independent green lineages (Chlorarachniophytes and Euglenids), and a red lineage (Chromalveolates). The Chlorarachniophytes, such as *Bigeloviella natans*, have a plastid surrounded by four membranes. They have retained a relic of the endosymbiont algal nucleus, called a nucleomorph, between the two innermost and the two outermost membranes of their plastid [44] (Fig. 2B). On the other hand, some Euglenozoa such as *E. gracilis* contain a plastid limited by three membranes, and they lack a nucleomorph. Parasites of the Trypanosomatidae phylum, such as *Trypanosoma brucei*, belong to Euglenozoa, but have no plastid.

The “red lineage”, in which a red alga is believed to have been engulfed by another eukaryote, is thought to account for all the other plastid-bearing protists. Significant biodiversity is represented in this lineage, including Cryptomonads, such as *Guillardia theta*, which have conserved a nucleomorph, Haptophytes, such as *Nannochloropsis gaditana*, Heterokonts, such as the diatoms *P. tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*, Chromerida, such as *Chromera velia*, and the closely related phylum of Apicomplexa, comprising human parasites such as *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. Cavalier-Smith has proposed that most secondary endosymbionts of the red lineage can be grouped as Chromalveolata [45], a super-group which might not be monophyletic [46,47]. They were also shown to have been subjected to large transfers of genes from a green algal origin, proposed to be from a secondary endosymbiosis involving a green alga prior to the red algal endosymbiosis that is believed to be common to all Chromalveolates [48]. The nuclear genomes of Chromalveolata are therefore chimeric, a feature we shall consider further later on. Alveolata, including Apicomplexa and Chromerida, and Heterokontophyta, including Diatoms and Eustigmatophytes discussed here, seem to be monophyletic within the Chromalveolata.

With respect to lipid metabolism it is well known that cyanobacteria, primary and secondary plastids all contain a machinery to generate fatty acids in their stroma, the dissociated fatty acid synthase of type II (FASII) [49]. These fatty acids are used as building blocks for glycerolipids, including the galactoglycerolipids discussed here. Fatty acids are successively esterified to the sn-1 and sn-2 positions of glycerol-3-phosphate to generate phosphatidic acid (PA), which is then dephosphorylated to form diacylglycerol (DAG), the universal precursor for galactoglycerolipids (for review, [50,51]). In green algae and in plants, the assembly of galactolipids has progressively evolved from a utilization of PA/DAG precursors synthesized de novo within the plastid, like in cyanobacteria (the so called “prokaryotic” pathway), to the utilization of diacylmoieties imported from the endoplasmic reticulum (the “eukaryotic” pathway) [52–54]. We shall therefore focus on the evolution of the synthesizing enzymes per se, which is of relevance for the first transition (cyanobacteria to primary chloroplasts), and also on the evolution of the upstream pathways, which generate the substrates for galactoglycerolipids.

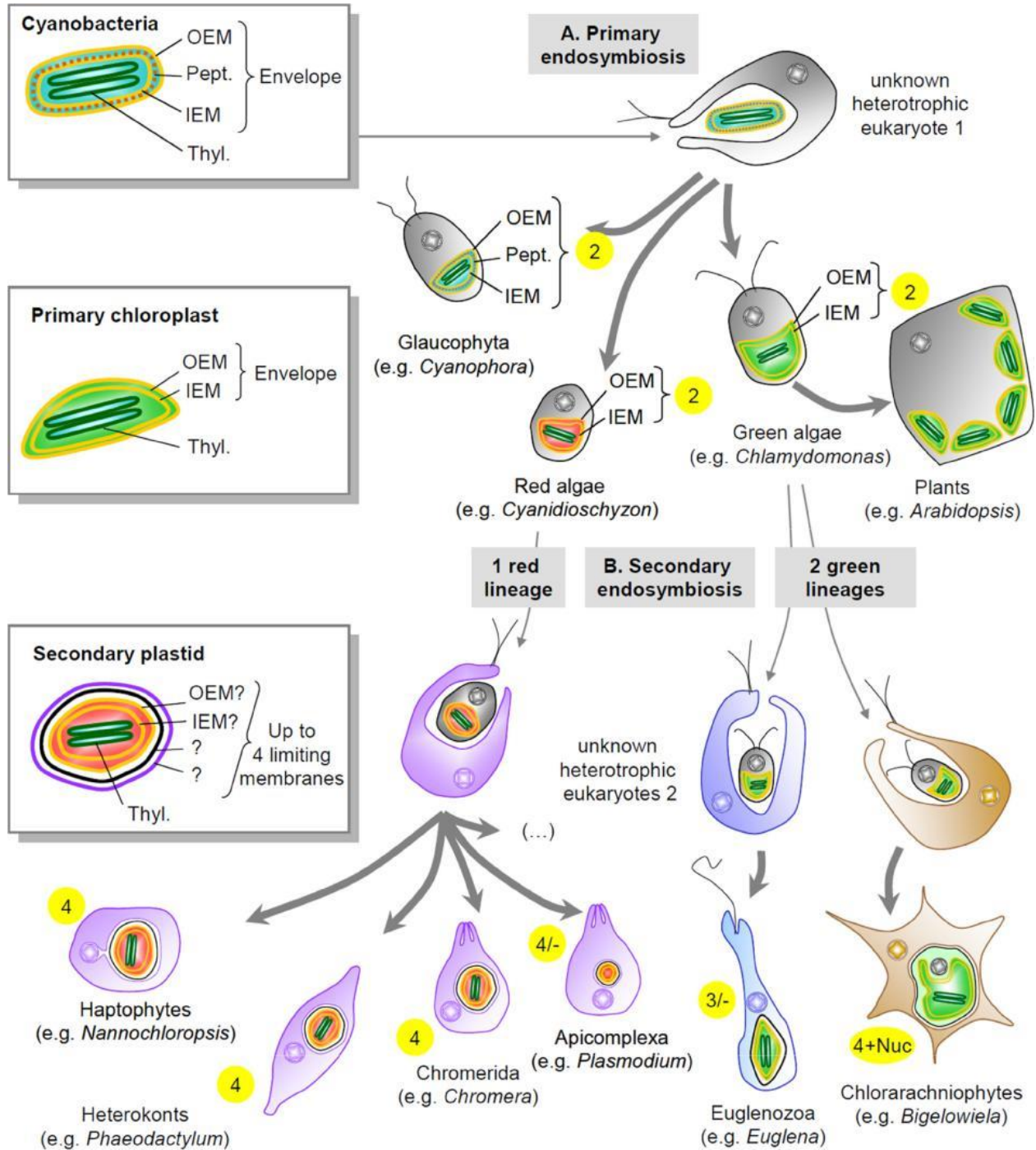


Fig. 2. Schematic representation of plastid evolution. (A) Primary endosymbiosis. In the upper panel, a single primary endosymbiosis between an unknown heterotrophic eukaryote and a Gram-negative cyanobacterium led to the three primary-plastid-bearing lineages, i.e., the “blue” lineage (glaucocystophytes), the “red” lineage (red algae) and the green lineage (green algae and plants, forming together the Viridiplantae clade). The primary plastid is always surrounded by an envelope containing two membranes, vertically inherited from the two membranes limiting the cyanobacterium (see schemes in figures on the left side). An independent endosymbiosis has led to the emergence of *Paulinella*, not shown in this figure. (B) Secondary endosymbiosis. Two types of secondary endosymbioses involving two different green algae and unrelated unknown heterotrophic eukaryotes led to Euglenozoa and Chlorarachniophytes. A single endosymbiosis between a red alga and a heterotrophic eukaryote probably led to all remaining plastid-bearing protists. Loss of photosynthesis is pervasive in several lineages. The number of membranes limiting primary and secondary plastids is highlighted in yellow: (2), (3) or (4). Phyla that include species that have lost their plastids are indicated: (3/-) and (4/-). Phyla in which the primary nucleus has been conserved as a nucleomorph are indicated: (4+Nuc). To maintain simplicity, the proposed origin of diatoms and other Chromalveolates from serial secondary endosymbioses involving both a green and a red alga [48] in (4) are not shown.

Concerning the second transition (primary to secondary plastids), information is scarce and the field of research is still open for a range of fundamental investigations. Little is known regarding the localization of galactoglycerolipids in the secondary

plastid membranes, or about their biosynthetic machinery and their integration into the general scheme of cellular metabolism. We have thus compared pathways based on available molecular and biochemical data, highlighting enzymatic reactions that

appear to be conserved and some that may have diverged or been lost.

2. Biosynthesis of galactoglycerolipids in cyanobacteria

Cyanobacteria have been primarily classified as Gram-negative bacteria [55]. Their cell envelope is composed of an outer and a plasma membrane, separated by a peptidoglycan layer [56]. In addition to MGDG, DGDG, PG and SQDG, cyanobacteria were shown to also contain a very low proportion of a monoglucosyl-dia-cylglycerol, or MGlcDG [55]. The glucosyl group is in β conformation, forming 1,2-diacyl-3-O-(β -D-glucopyranosyl)-sn-glycerol, or β MGlcDG (see Fig. 1). This lipid has been detected in major phyla of cyanobacteria, including strains of the Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria (PCC), a library initiated by Stanier in the late 1960s (see Supplementary Table 1 and Fig. 3). Although MGlcDG seems to be absent in some cyanobacteria (see Supplementary Table 1), suggesting that MGDG could be synthesized directly without this intermediate (see below), its occurrence, even at very low levels, has been assumed based on MGlcDG detection in other strains of the same taxonomic clusters. In Gloeotheca, a group now called Gloeobacter, all tested strains seem to lack MGlcDG (see Supplementary Table 1 and Fig. 3). On average, cyanobacteria thus contain 52% MGDG, 15% DGDG, 22% PG, 9% SQDG and 0–1% MGlcDG.

Because a unique primary endosymbiosis is at the source of all plastids (with the exception of the Paulinella example discussed above), the question of the uniqueness of a biosynthetic pathway to generate all galactoglycerolipids in cyanobacteria is critical. The biosynthetic scheme was first analyzed by biochemical approaches. Enzymatic activities responsible for the production of phosphatidic acid (PA), i.e., glycerol-3-phosphate acyltransferase and lyso-PA acyltransferase activities, were first characterized in *A. variabilis* [57–59]. These enzymes use fatty acids thio-esterified to the acyl carrier protein generated by the activity of FASII.

The production of MGlcDG synthesis was then measured in *A. variabilis* [60–62]. Labeling experiments using [14 C]-bicarbonate showed that the synthesis of MGlcDG preceded that of MGDG suggesting that MGlcDG served as a precursor for the synthesis of galactolipids. Conversion of MGlcDG into MGDG by an epimerase was indeed characterized in both *A. variabilis* [60–62] and *A. nidulans* [63], i.e., by stereochemical isomerization of the carbon-4 of the glucosyl group, and not by a replacement of glucose by

galactose. DGDG synthesis was then shown to occur by transfer of a galactosyl group (and not a repetition of a glucosyl transfer followed by an isomerization) to MGDG [60–62]. The complete bio-synthetic pathway can therefore be summarized as in Fig. 4, at least as initially characterized biochemically in *Anabaena*, *Anacystis* and eventually in the best studied model *Synechocystis*.

Interestingly, one of the most ancient cyanobacterial lineages also contains enzymes that were shown to be related to eukaryotic MGDG synthases (called “MGDs”), capable of synthesizing MGDG in one step, from DAG and UDP-Gal, just like in eukaryotic algae and plants. For example, in *Gloeobacter violaceus* Yuzawa et al. re-reported the presence of a sequence forming a clade with different MGD homologues from green non-sulfur bacteria, *Chloroflexus aurantiacus* and *Chloroflexus aggregans* [64]. Supposing that chloroplasts derive from an ancient cyanobacterium, it could be hypothesized that a cyanobacterial MGD may be at the origin of algal and plant MGDs; this cyanobacterial MGD might be lost in modern cyanobacteria besides a few species such as *Gloeobacter*. But in contradiction with this hypothesis, rigorous phylogenetic analyses [64] rather support that the *Gloeobacter* MGD may find its origin in a more recent *Chloroflexi*? *Gloeobacter* horizontal gene transfer [64]. Nevertheless, one cannot exclude that such horizontal transfer might have occurred with the primal cyanobacteria, the mother of all plastids.

2.1. Enzymes synthesizing MGlcDG

Amongst prokaryotes, MGlcDG, with β -anomeric configuration of the glucose, is not unique to cyanobacteria. In particular, it has been found in *Bacillus subtilis*, where it accounts for 10% of the lipids [65]. Furthermore, in the cell-wall less bacterium *Acholeplasma laidlawii*, a MGlcDG in an α -anomeric configuration of glucose represents the most abundant lipid, accounting for about half of the lipids in these membranes [66]. Genes coding for the corresponding β -MGlcDG and α -MGlcDG synthases in these bacterial models have been cloned and characterized [67,68] but no ortholog has been identified in available complete cyanobacteria genomes. Awai et al. in 2006 [40] resolved the question with an elegant strategy. They first considered that the gene for MGlcDG synthase should be conserved between two sequenced cyanobacteria, the unicellular *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain and the filamentous *Anabaena* sp. PCC 7120. They then assumed two characteristics of the enzyme, namely that its sequence should harbor a glycosyltransferase motif, and that its annotation should fall into the category of

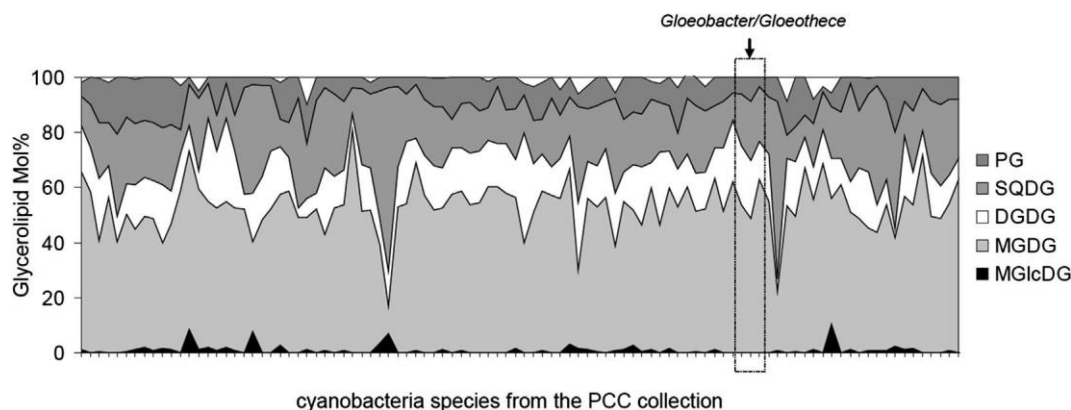


Fig. 3. Systematic analysis of the glycerolipid profiles of cyanobacteria from the PCC collection. MGDG, DGDG, SQDG, PG and MGlcDG have been analyzed in 98 strains of the Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria, covering at least 2 representative groups of the following species: *Anabaena*, *Arthrospira*, *Calothrix*, *Chamaesiphon*, *Chroococcus*, *Cyanotheca*, *Cylindrospermum*, *Geitlerinema*, *Gloeocapsa*, *Gloeotheca/Gloeobacter*, *Leptolyngbya*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Pseudanabaena*, *Scytonema*, *Synechococcus* and *Synechocystis*. Dotted frame highlight *Gloeotheca/Gloeobacter* strains apparently missing MGlcDG. Graph was built with values reported in Supplementary Table 1, based on analyses kindly provided by A.J. Dorne.

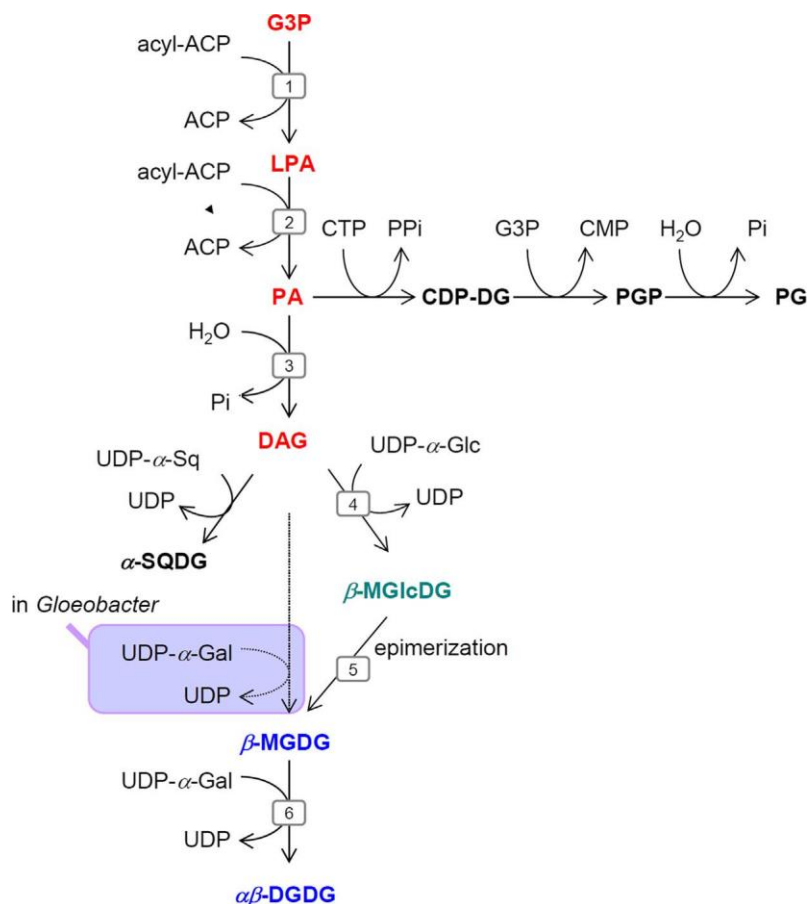


Fig. 4. Biosynthesis of galactoglycerolipids in cyanobacteria. (1) sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase or ATS1, (2) 1-acylglycerol-phosphate acyltransferase or ATS2, (3) phosphatidate phosphatase, (4) MGlcDG synthase; (5) epimerase, (6) dgdA-type DGDG synthase. The SQDG synthase, CTP: phosphatidate cytosine transferase, glycerol-3-phosphate:CDP-diacylglycerol phosphatidyltransferase, phosphatidylglycerol synthase are also shown. In cyanobacteria, a major difference occurs in the synthesis of galactolipids, by a two-step process involving a synthesis of MGlcDG followed by an epimerization of the glucose polar head into galactose, thus forming MGDG (see text). In *Gloeobacter*, a MGD-like enzyme, catalyzing the direct synthesis of MGDG using UDP-Gal, has been acquired by a recent horizontal transfer.

genes with unknown function. Out of the four gene candidates identified based on these criteria in *Synechocystis*, only one, sll1377, led to the synthesis of b-MGlcDG when expressed in *Escherichia coli*. One ortholog was found in *Anabaena*, all3944. MGlcDG synthase was shown to use UDP-Glc and DAG as substrates [40]. A systematic survey of available cyanobacteria genomes subsequently showed the presence of an ortholog in all species, with >40% identity in amino acids.

MGlcDG synthase sequences show putative membrane spanning domains in the N- and C-terminal regions of the protein. MGlcDG synthases also contain two motifs (D...DXD and QXXRW) found in the GT2 family of glycosyltransferases classified in the CAZy database (carbohydrate-active enzymes database; <http://www.cazy.org/>) [69]. The GT2 family contains inverting glycosyl-transferases such as cellulose synthases or chitin synthases. The activity of the MGlcDG synthase linking glucose in a β configuration is thus consistent with this classification. Glycosyltransferases containing D...DXD and QXXRW motifs also occur in the GT21 family. Glycosyltransferases containing such a sequence motif in the CAZy database include processive enzymes. In addition, like other GT2 proteins, MGlcDG synthase was shown to require divalent cations, in particular magnesium [40]. Interestingly, plant and algal MGDG synthases, which are also inverting enzymes, do not belong to either the GT2 or GT21 family (see below).

We found a putative ortholog of the MGlcDG synthase in *Paulinella chromatophora*, (RefSeq YP_002049084) with 43% identity and a Blast E-value of 5×10^{-97} , supporting the hypothesis that in the

chromatophore of Rhizaria, MGlcDG is synthesized like in cyanobacteria. The *P. chromatophora* sequence is presently annotated as a glycosyltransferase of the GT2 family. Functional analysis is now required to confirm this activity in chromatophore organelles.

Concerning chloroplasts, no ortholog of MGlcDG synthases has been found in any algal or plant genome [40]. Based on comparative genomic surveys, MGlcDG synthases appear therefore restricted to cyanobacteria and possibly to the chromatophore of Rhizaria.

The localization of the cyanobacterial MGlcDG synthases has not been unambiguously assessed yet, although the presence of membrane spanning domains indicates a tight association with membranes. Based on membrane fractionation and enzymatic measurements, MGlcDG synthase activity was detected in both thylakoid and plasma membranes of *A. nidulans* [63].

2.2. Epimerases converting MGlcDG into MGDG

The search for the epimerase acting on the conversion of b-MGlcDG into b-MGDG is still open for investigation and is one of the last challenges to fully understand galactoglycerolipid synthesis in cyanobacteria. No epimerase candidate genes have been found associated with any MGlcDG synthase operon [40], and of the nine epimerases currently listed in the annotation of *Synechocystis* PCC6803 (according to the reference database Cyanobase, <http://genome.microbedb.jp/cyanobase/Synechocystis>), none appear to act on a glucolipid substrate.

2.3. Enzymes synthesizing DGDG

As for MGlcDG synthase, the identification of the cyanobacterial gene coding for a DGDG synthase, called *dgdA*, was determined based on comparative genomic studies. In 2007, Awai et al. [41] and Sakurai et al. [42] simultaneously reported the discovery of the same *dgdA* gene in both *Synechocystis*, slr1508, and in *Anabaena*, alr4178. The first group had previously reported the identification of MGlcDG synthase amongst 4 genes of *Synechocystis* containing glycosyltransferase motifs and being functionally uncharacterized. They added a third criterion, specifically, the presence of a similar sequence in the genomes of Cyanidophytina, a red alga living in very acidic environments that lack the eukaryotic DGD gene, e.g., *C. merolae*, *Cyanidium caldarium* and *Galdieria sulphuraria*. They thus identified a unique candidate gene in *Synechocystis* and *Anabaena* and assessed function based on the lack of DGDG in knockout lines of cyanobacteria, and on synthesis of DGDG after heterologous expression in *E. coli* [41]. The second group had a similar approach, using a supervised phylogenetic profiling to identify putative glycosyltransferase genes shared by cyanobacteria and Cyanidioschyzon, and not present in green plants. They based the functional characterization on single gene knock-out analyses [42]. The *dgdA* protein belongs to the GT4 family of the CAZy classification [69], just like the unrelated DGD proteins catalyzing the synthesis of DGDG in all algae and plants, with the notable exception of some red algae.

When *E. coli* expresses the *Synechocystis dgdA* gene, the synthesis of α -DGDG can only be detected if a plant β -MGDG synthase is coexpressed and UDP-Gal provided [41]. By contrast, when *dgdA* is coexpressed with a β -MGlcDG synthase, no diglycosyl-lipid is synthesized, showing that MGlcDG is not a substrate for *dgdA*. This specificity is, on the one hand, consistent with previous analyses showing that α -MGlcDG and α -MGDG produced in *Synechococcus* following genetic engineering are not used for the synthesis of α -Gal- α -GlcDG or $\alpha\alpha$ -DGDG [70]. On the other hand, this result confirms the biosynthetic scheme shown in Fig. 4. In the absence of a reliable assay to measure the activity of *dgdA*, the subcellular localization has not been documented by enzymatic detection in sub-cellular fractions and should therefore be obtained by proteomic analyses of membrane fractions.

As for the conservation of a cyanobacterial gene synthesizing DGDG in eukaryotes, we could only identify a sequence in the genome of *P. chromatophora* (RefSeq YP_002049341) coding for a *dgdA* ortholog. This again supports the inheritance of biosynthetic pathways from modern cyanobacteria in the chromatophore of *Rhizaria*, with an evolutionary story that is distinct from that of chloroplast-containing eukaryotes.

Interestingly, whereas MGlcDG synthase, and possibly the associated epimerase, have been totally lost in chloroplasts, being replaced by a simple MGDG synthase, *dgdA* has been retained in some red algae even though it has been lost in the vast majority of algae and all plants. Thus, the loss of the enzymes of the cyanobacterial pathway has not occurred in a single step during the early evolution of primary plastids.

3. From cyanobacteria to primary plastids: emergence of a new galactolipid synthetic pathway

The galactolipid biosynthetic pathway in primary chloroplasts has been mainly characterized enzymatically in angiosperms and in a few green algal models. Once MGDG synthase (MGD) and DGDG synthase (DGD) genes had been identified in angiosperms [38,39], it was rapidly evident that this pathway did not derive from the ubiquitous cyanobacterial system, and that this innovation was shared by all eukaryotic plastids, from Archaeplastida

(Glaucophyta, Red algae, Green algae, plants) to secondary endosymbionts. In all cases, the biosynthesis of MGDG and DGDG was reported to occur in the outer envelope of chloroplasts. We start the description of the evolution of this pathway with the source of the diacyl-precursors that are utilized because cooperation between the plastid and other compartments of the cell, most notably the endoplasmic reticulum, is an important innovation that has occurred here.

3.1. Diacyl-precursors for MGDG and DGDG synthesis

3.1.1. Neosynthesis of C18/C16 phosphatidic acid and diacylglycerol in the stroma of chloroplasts (prokaryotic pathway)

Some of the lipid biosynthetic machineries have been remarkably well conserved in the cyanobacteria primary chloroplast transition, e.g. the biosynthesis of fatty acids, thio-esterified to the acyl carrier protein (in angiosperms: 16:0-ACP and 18:0-ACP), is carried out by the same enzymatic system found in prokaryotes, i.e., an acetyl-CoA carboxylase complex and a fatty acid synthase of type II (FASII) (see above and [49]). Furthermore, some fatty acids generated inside the chloroplast harbor features that make them useful as signatures allowing their detection when esterified to glycerolipids, such as the length (in general C16 or C18), the number of double bonds (like the desaturation of C16:0 to C16:3 or C16:4 in numerous algae and plants), as well as specific transfers to positions sn-1 and sn-2 of glycerol-3-phosphate (G3P). Desaturation of chloroplast fatty acids can be initiated by a stromal Δ -9 acyl/stearoyl-ACP desaturase (FAB2) that catalyzes the synthesis of 18:1-ACP from 18:0-ACP [71]. In some tissues or in certain organisms the desaturation of 16:0-ACP into 16:1-ACP can also be catalyzed [72]. De novo fatty acids can then be used either in chloroplasts or exported to the cytosol where they feed the cytosolic pool of acyl-CoAs [35,49,73–75].

The synthesis of G3P, the other important building block of glycerolipids, can occur in the stroma [75]. Using acyl-ACP and G3P, the envelope is known to be the site of biosynthesis of PA and DAG, by the stepwise action of sn-glycerol-3-phosphate acyl-transferase (ATS1) in the stroma, a 1-acylglycerol-phosphate acyl-transferase (ATS2) in the IEM, and a phosphatidic acid phosphatase (PAP) in the IEM [76] (Fig. 5). In the case of angiosperms, the specificity of ATS1 and ATS2 leads to the production of PA and DAG with 18:1 and 16:0 at positions sn-1 and sn-2, respectively. The glycerolipids assembled in the plastid, with 16-carbon fatty acids at the sn-2 position, harbor a diacyl-structure similar to that observed in cyanobacterial glycerolipids, named therefore a 'prokaryotic' structure [35,37,75,77].

3.1.2. Import of extraplastidial C18/C18 and C16/C18 diacyl-precursors (eukaryotic pathway)

In the endoplasmic reticulum of angiosperm cells, acyl-CoAs and G3P are used for the stepwise synthesis of PA and DAG within the ER, with 16:0, 18:0 or 18:1 at sn-1 and 18:0 or 18:1 at sn-2 positions. Membrane glycerolipids assembled in the ER, with 18-carbon acyls at sn-2 position, have a diacyl structure defined as 'eukaryotic' [35,37,75,77]. Import of precursors from the ER to the chloroplast is reflected by the high proportion of this eukaryotic signature in galactoglycerolipids. This import system was first described by Ohlrogge and Browse in 1995 [78]: the plastid pathway is known as the prokaryotic pathway, whereas the endoplasmic route is known as the eukaryotic pathway.

An important issue concerns the dual origin of PA/DAG substrates in all primary plastids, and the presence of a eukaryotic pathway in all these organisms. In green algae, this has been particularly well studied in *Chlorella kessleri*, thanks to a careful analysis of fatty acids at the sn-1 and sn-2 positions of glycerolipids [79]. In this study, galactolipids contained almost exclusively C18 acyls at the

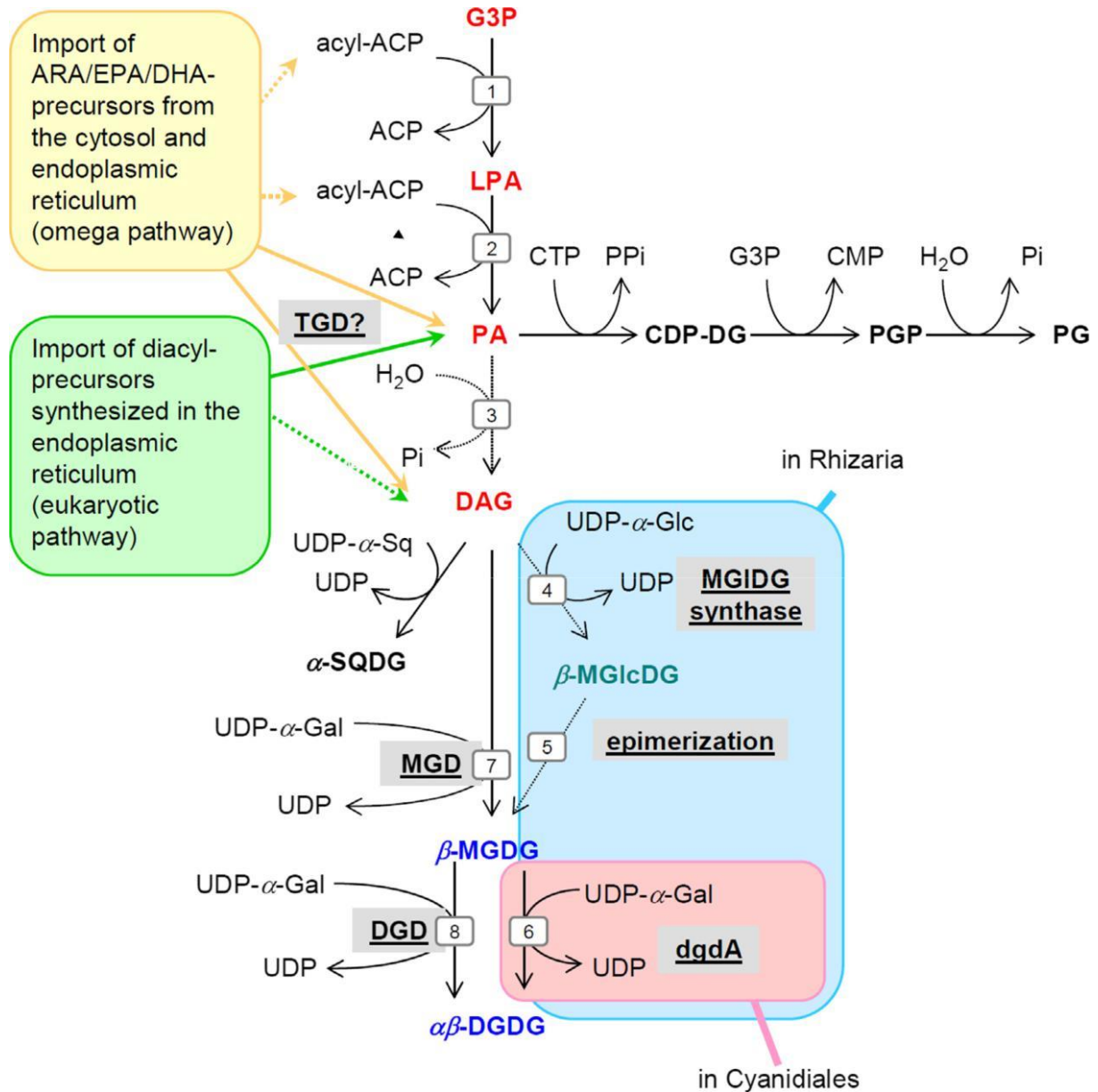


Fig. 5. Biosynthesis of thylakoid lipids in the chloroplast envelope of angiosperms. (1) sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase or ATS1, (2) 1-acylglycerol-phosphate acyltransferase or ATS2, (3) phosphatidate phosphatase, (4) MGlcDG synthase; (5) epimerase, (6) dgdA-type DGDG synthase, (7) MGDG synthase or MGD, (8) DGDG synthase or DGD. The synthesis of PG and SQDG are also shown. The catalysis of DGDG via a cyanobacterial dgdA-type enzyme is unique to Cyanidiales, a sub-group of red algae. The genome of the chromatophore of Paulinella encodes the cyanobacterial enzymes. Dotted lines indicate hypothetical precursor transfers that still need to be demonstrated.

sn-1 position whereas the sn-2 position contained both C16 and C18 acyls. Based on the structural definition given above, MGDG was found to contain 65% of prokaryotic molecular species and 35% of eukaryotic ones. By contrast, and with a similar trend to that observed in higher plants, DGDG contained 68% of eukaryotic structures. Pulse-chase experiments using [¹⁴C] acetate showed that MGDG and DGDG were primarily labeled as C18/C16 (pro-karyotic) molecular species, and subsequently as C18/C18 (eukary-otic) molecular species, with a concomitant decrease of C18/C18 labeling in extraplastidial phosphatidylcholine [79]. This study supports the existence of a eukaryotic pathway in green algae functionally related to that described in Angiosperms, with a route of lipid intermediates coming from PC and feeding the chloroplast with precursors for the synthesis of galactolipids. Today, besides the TGD machinery that is conserved in green algae, components of the machinery that specifically divert PC to feed galactolipid

synthesis are unknown and it is therefore difficult to speculate on the evolution of this system.

3.1.3. Import of extraplastidial x3/x6 very-long chain polyunsaturated acyl precursors (omega pathway)

In addition to the ER ? chloroplast route that has been studied in great detail in Chlorophyta and Embryophyta, the elaboration of fatty acids with more than 20 carbons, containing multiple double bonds and forming the so called very long chain poly-unsaturated fatty acids (VL-PUFAs), requires elongase and desaturase activities that are associated with the cytosol and the endoplasmic reticulum [27]. The presence of such fatty acids like all-cis-D^{5,8,11,14} 20:4 x-3, arachidonic acid, or ARA), all-cis-D^{5,8,11,14,17} 20:5 (C20:5 x-3, eicosapentaenoic acid, or EPA) and all-cis-D^{4,7,10,13,16,19} 22:6 (C22:6 x-3, docosahexaenoic acid, or DHA) in galactolipids is a clear evidence of an ER/cytosol ? chloroplast

import (Fig. 5). These fatty acids have been identified in primary plastids in the green lineage (e.g., *Chlorella minutissima* [80]) as well as the red lineage (e.g., *Porphyridium purpureum*, previously known as *P. cruentum* [81]). The biosynthesis of x3/x6-VL-PUFAs in the cytosol of *P. purpureum* has been exquisitely dissected using externally supplied fatty acids and precursors [82,83], and the identified activities serve as a reference to better understand the conservation of this pathway in the cytosol of other organisms. Interestingly, based on a specific inhibitor response, it was shown that part of the synthesis of x3/x6-VL-PUFAs requires FAs to be linked to PC, for the C18:1 ? C18:2x6 desaturation catalyzed by a D12-desaturase. Following desaturation of C20, FAs would then occur on various phospholipid classes (for review, [27]). ARA/EPA-rich-PC could then be a source of ARA/EPA-rich DAG, used as precursor for other lipid classes including MGDG. In the chloroplast, a D17-(x3) desaturase was proposed to convert ARA-MGDG into EPA-MGDG [82]. Regardless of this activity that allows ARA ? EPA conversion in chloroplasts, all of the x3/x6-VL-PUFAs found in galactolipids are likely to originate from the cytosol.

In the case of the green alga *C. minutissima*, diacylglycerol-N,N,N-trimethylhomoserine (DGTS) is composed of up to 44% of total lipids, which is accompanied by PC as the major phospholipid. In *C. minutissima*, both positions of DGTS are acylated with EPA (>90% of total). The DGTS level shows a rhythmic fluctuation with time which is inversely correlated with the level of MGDG and it has thus been proposed that EPA in galactolipids might originate from EPA in extraplastidial DGTS [80]. In the case of the red alga *P. purpureum*, pulse-chase labeling with radioactive fatty acid precursors showed incorporation into EPA-rich PC and TAG and, during the chase, a decrease of the labeling of these lipids and an increase of that of MGDG. It was thus concluded that TAG could supply EPA precursors for the biosynthesis of MGDG [81].

Could x3/x6-VL-PUFAs found in galactolipids be imported via a similar mechanism as the C18/C18 eukaryotic system? Is there a specific import of free fatty acids for ARA, EPA or DHA? Alternatively, is there a transfer of a diacyl moiety from extraplastidial phospholipids to feed MGDG synthesis? This overall import system is called here the omega pathway. Is the TGD machinery involved in this route? To our knowledge, these questions are still unresolved.

3.1.4. Evolution of plastidial and extra-plastidial pathways

The evolution of the integrated prokaryotic/eukaryotic systems has not been investigated extensively in green and red algae. In particular, understanding of the evolution of the x3/x6-VL-PUFA import system requires more data. It will be extremely important to address this question in the future since the omega pathway for the synthesis of MGDG and DGDG has been conserved in secondary endosymbionts (see later).

In angiosperms, Mongrand et al. (1998) have provided the most comprehensive analysis, by searching for correlations between the existence of the prokaryotic and eukaryotic pathways and the evolutionary position of different organisms (Fig. 6) [54,84]. By using all-cis-D^{7,10,13} C16:3 as a marker for the existence of the plastidial pathway, they studied the overall fatty acid composition of 468 plant species distributed among 141 botanical families. The synthesis of galactoglycerolipids using prokaryotic precursors was found to have been lost during evolution and, in the case of dicots, this loss occurred independently in numerous groups and at different rates [54]. A trend can therefore be noted in the upstream pathway feeding galactolipids, characterized by an increasing dependence on imported precursors from the ER. The importance of this phenomenon has been established in angiosperms, but it remains to be investigated in algae, in particular concerning the analogous import of eukaryotic diacyl-substrates and the specific case of VL-PUFA precursor import.

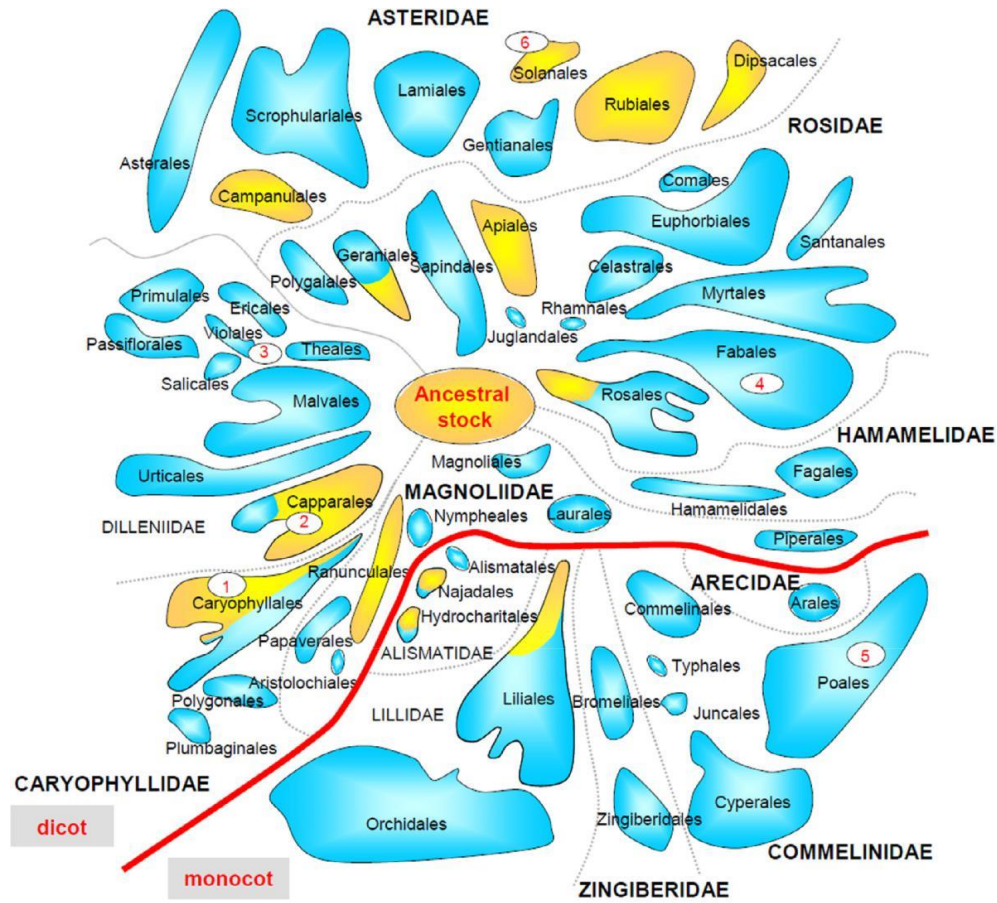
In conclusion, there has been an intense adaptation of the pathways feeding galactolipids with PA and DAG precursors, with a clear trend towards an import from the cytosol. Indeed, besides plastidial PG, whose synthesis seems to be highly dependent on the conservation of a prokaryotic production of PA [76], it seems that during the course of evolution MGDG and DGDG synthesis relies more and more on extraplastidial substrates. The “long” path for FAs, first synthesized in the stroma, then reaching the endoplasmic reticulum where they are incorporated into phosphoglycerolipids, and then imported back into the chloroplast, appears to be a costly system compared with the local production and utilization of FAs for chloroplast lipids via the prokaryotic route. The emergence of a specific import system might therefore provide benefits that could ensure a better fitness. One such benefit could be an improved integration of biosynthetic pathways in the ER and the chloroplast at the whole cell level [51,85]. This has been proposed in the context of the activation of MGDG synthases from angiosperms by extraplastidial PA [51,85]. This feature appears therefore to be important in order to understand the evolution of galactolipid synthesizing enzymes.

3.2. Evolution of galactoglycerolipid synthesis in primary endosymbionts

3.2.1. MGDs

As detailed above, in cyanobacteria MGDG is not synthesized by a homolog of MGDG synthase, but by a two-step process. This raises several questions, such as (i) the importance of conserving MGDG in photosynthetic membranes, (ii) the reasons for the loss of the MGLCDG synthase/epimerase system, and (iii) the origin of MGDG synthases in eukaryotes following the primary endosymbiosis. MGD enzymatic activities have been analyzed in great detail in Angiosperm models. MGD proteins belong to the GT28 family of glycosyltransferases classified in the CAZy database [69]. The presence of MGD orthologs in all primary endosymbionts analyzed to date, except Rhizaria, has been reported in numerous comparative phylogenies. In green and red algae, only one MGD gene is usually detected [64,86]. In the green alga *C. reinhardtii*, it has thus been annotated as MGD1, although no other paralog has yet been detected [87].

Molecular phylogenetic analysis of MGD sequences has been recently published by two teams [64,86] drawing similar conclusions on the origin of contemporary plant MGDs. Both were based on amino acid sequence alignments, maximum likelihood and Bayesian inference. The more thorough analysis [64] included four million iterations, rather than the classical 10–20 thousands to determine phylogenetic trees. These studies support the lateral transfer of a MGDG synthase ancestral gene from a chlorobacterium ancestor of the Chloroflexi type. Based on these phylogenetic reconstructions, the analysis of MGDs from Rhodophyta, Chlorophyta and Embryophyta show a monophyly and a single ancestor. The modern group of Chloroflexi comprises anoxygenic phototrophic bacteria, having diverged before cyanobacteria. The in vitro analysis of the substrate specificity and anomeric configuration of the sugar head group for the three prokaryotic genes closely related to eukaryotic MGDs in *Roseiflexus castenholzii* showed one member that encoded a MGDG synthase [64]. Other studies have explored the possibility that a Chlorobacterium type gene might have been transferred [88]. When and how this horizontal transfer of a MGD gene from a Chloroflexi ancestor to the nuclear genome of an early chloroplast-bearing eukaryote has occurred is unknown. A large-scale phylogenetic analysis has revealed that a considerable amount of non-cyanobacterial genomic material has been acquired prior to red and green lineage divergence [89]. The analysis of the genome of *C. paradoxa* has also highlighted important gene transfers from a Chlamydia-like ancestor, also supporting



1, *Spinacia*; 2, *Arabidopsis*; 3, *Cucumis*; 4, *Pisum*, *Medicago*, *Lotus*, *Glycine*; 5 *Zea*, *Hordeum*; 6, *Lycopersicon*.

	sn-1/sn-2	C16:3 plants	C18:3 plants
gal		C18:3/C16:3	-
gal		C18:3/C18:3	C18:3/C18:3

Fig. 6. Evolution of the plastidial (prokaryotic) and extra-plastidial (eukaryotic) pathways, generating substrates for galactoglycerolipids in Angiosperms. Two kinds of angiosperms have been distinguished based on their x3-trienoic fatty acid composition in photosynthetic tissues. The *cis*-9,12,15-octadecatrienoic acid/*cis*-7,10,13-hexadecatrienoic acid (or C18:3/C16:3) balance reflects the pathways that produce diacyl-precursors for galactoglycerolipids: a plastidial or prokaryotic one and an extra-plastidial or eukaryotic one. Mongrand et al. [54,84] have analyzed the correlation between the existence of these pathways and the evolutionary classification of Angiosperms. By using *cis*-7,10,13-hexadecatrienoic acid as a marker for the existence of the plastidial pathway, they studied the fatty acid composition of 468 plant species distributed among 141 botanical families. The lower part illustrates the distribution of major MGDG molecular species in C16:3 and C18:3 plants. The upper part of the figure shows the extrapolated distribution of so called C16:3 plants (in yellow) and C18:3 plants (in blue) in the classification of angiosperms. The blue color thus reflects the loss of the prokaryotic pathway in galactoglycerolipids. Number allows localizing major plants analyzed in the literature, 1, spinach; 2, Arabidopsis; 3, cucumber; 4, pea, alfalfa, soybean; 5, corn, wheat; 6, tomato.

that the primary endosymbiosis with a cyanobacteria had been accompanied by some associations with other prokaryotes who provided substantial portions of genetic material [90]. In the absence of any trace of the cyanobacterial system in eukaryotes, we thus propose that acquisition of Chloroflexi-type MGD likely occurred very early during the primary endosymbiotic process.

In angiosperms, MGD genes have evolved into two main types, denoted A and B, that were first characterized in spinach [91] and Arabidopsis [92]. Type A is characterized by a cleavable N-terminal region (about 100 amino acids) allowing targeting to chloroplasts via the translocon protein import system. By contrast, Type B is characterized by a very short non-cleavable N-terminus. In the

case of Arabidopsis, type A has only one member, MGD1, whereas type B has two members, MGD2 and MGD3 [92]. Based on in vitro enzymatic studies, analyses of subcellular fractions of chloroplast membranes, and GFP-fusion localization by epifluorescence microscopy [91–96], MGD1 was shown to be the most abundant and most active enzyme, localized in the inner envelope membrane, and to be essential for the expansion of thylakoids. This sub-cellular localization is consistent with the presence of an N-terminal transit peptide. A knockout of MGD1 [97] is lethal in the absence of an external source of carbon substrate [98]. MGD2 and MGD3 are in the outer envelope membrane and their expression is triggered in some stress conditions, such as a shortage of phosphate [92]. Simple and combined genetic disruptions of MGD2 and MGD3 genes have no striking phenotype in normal growth conditions [99], so these enzymes seem likely to act mostly in specific contexts like in response to phosphate starvation or in specific cell types such as elongating pollen tubes [100,101]. Type B seems therefore to be an invention of Angiosperms.

Based on the gene structures in Arabidopsis, MGD2 lacks two in-trons (Fig. 7), suggesting that the ancestral sequences for MGD1 and MGD3 originated from an early divergence marked by a deep

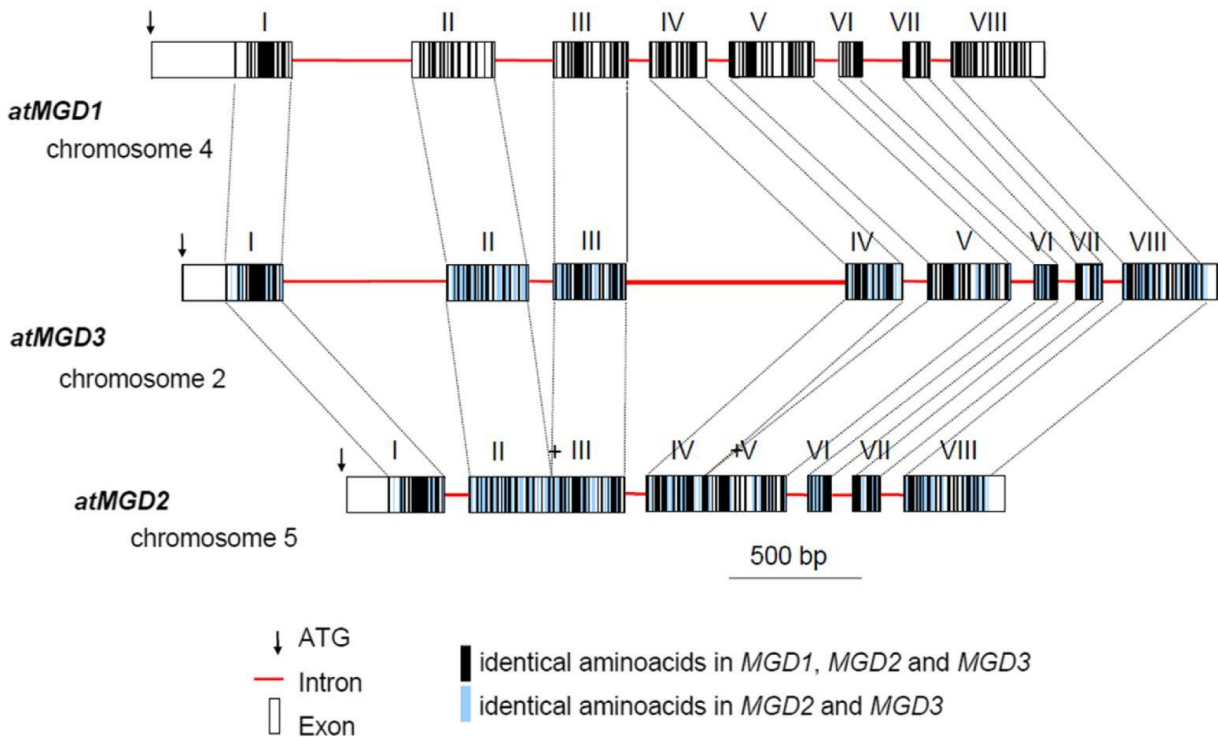
modification of the N-terminal region and that MGD2 originated likely from the duplication of a MGD3 ancestral sequence [92].

A comprehensive phylogenetic analysis has shown that Bryophytes had only one type of MGD and that the divergence between Type A and B preceded that of Gymnosperms and Angiosperms [64]. Based on phylogenetic tree calibrations, the A/B divergence was dated to around 320 million years ago, during the Carboniferous period, and so after the emergence of Spermatophyta. By comparing functional and phylogenetic studies, this recent evolution of MGD genes in Spermatophyta suggests an increased specialization of a novel type (Type B), at the periphery of chloroplasts, to respond to environmental changes (e.g., nutrient shortages) in the context of an intense membrane lipid remodeling within plant cells.

3.2.2. Cyanobacterial-type *dgdA* in Cyanidiales, a subdivision of Rhodophyta

By contrast with the synthesis of MGDG, two systems exist in eukaryotes to synthesize DGDG. A small number of sequenced red algae contain, in their plastid genome, orthologs of the cyanobacterial *dgdA* gene. The presence of *dgdA* is thus clear in the

A. MGD multigenic family in Arabidopsis



B. Emergence of MGDG synthases of type B

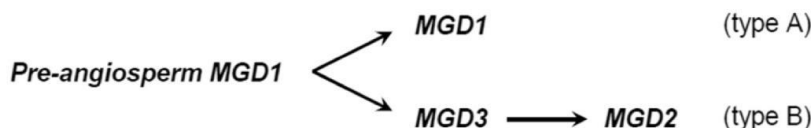


Fig. 7. Type A and Type B MGD genes. (A) Genomic organization of MGD1, MGD2 and MGD3 in Arabidopsis. Introns are presented as lines and exons as rectangles. Exons were compared for identical translated amino acids. Black rectangles, identical amino acids among the 3 proteins; blue rectangles, identical amino acids between MGD2 and MGD3 (not observed in MGD1). MGD1 has a longer N-terminal domain corresponding to a chloroplast transit peptide. (B) Model of evolutionary divergence leading to the two types of MGD proteins.

genomes of *C. merolae*, *C. caldarium* and *G. sulphuraria* [41,42]. Interestingly, *C. merolae* contains a typically eukaryotic MGD enzyme that was confirmed to have a MGDG synthase activity by expression in *E. coli* [41]. Cyanidiales contain species living in very acidic environments, which might have been isolated early after the primary endosymbiosis. The conservation of the *dgdA* gene in Cyanidiales supports an early divergence of this group amongst red algae and provides a clue about the loss of cyanobacterial galactolipid biosynthesis genes.

3.2.3. DGDs in all other primary endosymbionts (Rhodophyta, Glaucophyta, Chlorophyta and Plants)

Based on previous reports and on systematic surveys of genomic databases, no *dgdA* ortholog can be detected in the plastid genomes of multicellular red algae, including in *Gracilaria* or *Porphyra*. No *dgdA* gene could be found in the glaucophyta *Cyanophora*, the green alga *Chlamydomonas*, the moss *Physcomitrella*, nor in higher plants [41,87]. By contrast, orthologs of the DGD genes identified in Angiosperms [39] have been unambiguously identified in Glaucophyta, Chlorophyta and most Rhodophyta (except Cyanidiales, discussed above) [41,87]. DGD genes have also been found in the genome of the Bryophyte *Physcomitrella patens* [102].

In Angiosperms, two types of DGD genes could be identified based on primary sequences. One type, known as DGD1 in Arabidopsis, is a two-domain protein with an N-terminal segment of unknown function, and a C-terminal galactosyltransferase domain [103,104]. The second type, known as DGD2 in Arabidopsis, corresponds to a shorter amino acid sequence, consisting only of a galactosyltransferase domain. The DGD1 and DGD2 galactosyltransferase domains belong to the GT4 family defined in the CAZY classification [69].

The expression patterns of MGD1, MGD2, MGD3, DGD1 and DGD2 in different tissues of Arabidopsis or in response to some stresses, such as phosphate shortage, indicate that MGDs and DGDs act as specific pairs [34,92,100,104–107]. On the one hand, DGD1 and MGD1 are expressed in green tissues and the corresponding enzymes act together in the biogenesis of thylakoid lipids. On the other hand, DGD2 is expressed together with MGD2 and/or MGD3 and the corresponding enzymes act together to produce galactolipids in non-green tissues (including in roots and flower organs) and in response to environmental stress. Because MGD1 and DGD1 are localized in different membranes, the inner and outer envelope membranes, respectively, a specific transfer of MGDG from one membrane to the other is necessary. Furthermore, because MGD2/MGD3 and DGD2 are found in the outer envelope membrane, a metabolic channeling is supposedly made easier thanks to the co-localization of enzymes. Since Type B MGDs are unique to Spermatophyta, the emergence of this system might be optimal to respond to signaling processes occurring in the cytosol and at the periphery of the chloroplast.

The DAG ? MGDG ? DGDG channelling via the MGD1/DGD1 or the MGD2/MGD3/DGD2 system does not mean that all MGDG is used as substrates for DGDG. Only a fraction of MGDG, that with a eukaryotic structure, is converted into DGDG by the action of DGDG synthase [37]. In angiosperms, the fatty acid compositions of MGDG and DGDG are therefore different, with MGDG being 16:3-rich and DGDG being 16:3-poor. This observation suggests that (i) a desaturase (FAD5) catalyzes the very rapid desaturation of 16:0 into 16:1 at the sn-2 position of MGDG, and that (ii) 16:1, 16:2 and 16:3-MGDG species are not utilized by DGD1 and DGD2. This being said, one would expect that a correlation of the evolution of DGDs might have occurred, linking the evolution of MGD1 with DGD1, MGD2/MGD3 with DGD2 and possibly MGD1/ DGD1 with FAD5. These hypothetical co-evolutionary processes have not been explored yet.

In the genome of the Bryophyte *P. patens*, the four orthologous sequences (Phytdraft_162919, Phytadraft_137342, Phyta-draft_216055 and Phytadraft_218058) have longer N-terminal domains, like the angiosperm DGD1. Similarly, sequences in Chlorophyta, such as the unique DGD protein in *C. reinhardtii* (XP_001693597; Cre13.g583600), harbor longer N-terminal extensions like DGD1. By contrast, some sequences in Rhodophyta, like the unique DGD protein in *Chondrus crispus*, consist only of the GT4 domain, like the angiosperm DGD2. It seems therefore that the evolution of DGD genes is not simple. The conservation level of the GT4 domain seems furthermore to be higher than that of the N-terminal domain. The emergence of DGD2 in Spermatophyta might therefore correlate with the emergence of MGDs of Type B, but this hypothesis still needs confirmation.

4. From primary plastids to secondary plastids

4.1. The puzzling question of the lipidome of secondary plastids

Although the presence of MGDG and DGDG was confirmed decades ago in a range of important phyla including secondary endosymbionts deriving from green algae, e.g., *E. gracilis* [24], or Chromalveolata deriving from red algae, e.g., the non-photosynthetic diatom *Nitzschia alba* [108], the photosynthetic diatom *P. tri-cornutum* [25] and the eustigmatophyte *Nannochloropsis* [109,110], we still lack clear information about (i) the precise localization of galactoglycerolipids in the three to four membranes that delineate the secondary chloroplasts and (ii) the subcellular mapping of the biosynthetic enzymes. While it is common for secondary endosymbionts to have an intricate association of their chloroplasts and endoplasmic reticulum (often referred to as Chloroplast-ER) [111,112] various representatives of Chromalveolata such as *Ochromonas danica* and *P. tri-cornutum* also display continuity between the Chloroplast-ER and the nuclear membrane [111]. Other notable examples include Apicomplexans, which are characterized by the conservation of a reduced non-photosynthetic relict plastid, known as the apicoplast [113,114]. Apicomplexa is a phylum of unicellular eukaryotes that mainly comprises obligate intracellular parasites, responsible of major human diseases such as malaria and toxoplasmosis, respectively caused by *Plasmodium* spp. and *T. gondii*. To the exception of *Cryptosporidium* spp. and possibly free living gregarins, all Apicomplexa possess an apicoplast. Very recent analyses have provided evidence that neither MGDG nor DGDG were present in the apicoplast [115], indicating a rare but puzzling loss of the galactoglycerolipid biosynthetic pathway. Following secondary endosymbiosis, many genes were transferred from the endosymbiont to the host cell nucleus, which means that protein targeting mechanisms must have adapted accordingly to allow transport across the newly acquired membrane structure [116,117]. Here, we discuss how the metabolism of galactoglycerolipids has evolved following each of the secondary endosymbiotic events illustrated in Fig. 2.

Based on the variety of evolutionary scenarios, one possibility is that each lineage has had an independent evolution. The metabolic pathways in secondary endosymbionts combine metabolic routes inherited from the ancient cyanobacteria at the origin of chloroplasts, the primary endosymbiont genome, the secondary endosymbiont genome and multiple other organisms via horizontal transfers. Thus, in this part of the review, we do not try to define a unique scheme but rather address questions that in our opinion should be prioritized in future research.

4.2. Multiple possible systems to synthesize fatty acids de novo in the stroma and the cytosol

In most secondary endosymbionts studied so far, the neosynthesis of fatty acids occurs mainly via a FASII system likely to have

been inherited from the cyanobacterial progenitor of the plastid. In some species, e.g., *Nannochloropsis* and *Toxoplasma*, a cytosolic FASI also exists. In the case of a co-occurrence of both FASII and FASI, the most extensive biochemical studies have been performed in *T. gondii*, with apparently contradicting results [118,119] and in a galactolipid-free context. Current consensus is that the apicoplast pathway essential in Apicomplexa parasites as based on molecular disruption of the pathway. However, this essentiality differs depending on the parasite: whilst it is always essential for *T. gondii* [119], it appears to be only essential during Plasmodium asexual liver stages or mosquito sporozoite division stages [120–122]. Initial biochemical analyses have suggested that the *T. gondii* FASII was not essential for bulk lipid synthesis but rather for the apicoplast biogenesis and maintenance [118,119,123], possibly due to a chloroplast-analogous necessity for the synthesis of these lipids to be utilized during the growth and division of this organelle. However, more refined metabolic labeling experiments showed that the *T. gondii* FASII was responsible for the majority of the long chain saturated fatty acids [123]. Lipid analyses of the apicoplast of *P. falciparum* confirmed that this organelle was highly enriched in saturated fatty acids (90% of all fatty acids), mainly in C18:0 [115]. The C18:0-ACP desaturation activity might have been also lost in this organelle. Furthermore, the apicoplast seem to be able to utilize FA to generate PA by stepwise acylations of a G3-P backbone via a glycerol 3-phosphate acyltransferase (ATS1) and a lyso-phosphatidic acid (LPA) acyltransferase (ATS2/LPAAT), both predicted to be present in the apicoplast [51,121,124]. Recently, the disruption of the rodent malaria *P. yoelii* ATS1 gene led to the impairment of the biogenesis of the parasite intracellular compartments, including the apicoplast, during liver stages [125]. Together, these results suggest that the apicoplast might be involved in bulk lipid neosynthesis in Apicomplexa via the generation of FA, LPA and/or PA. The role of this prokaryotic pathway in the absence of galactoglycerolipids remains to be fully understood. The respective roles of FASII in the apicoplast and of FASI and fatty acid elongase in the cytosol of *T. gondii* has been recently analyzed in the context of a parasitic life style of this Apicomplexa [123,126].

The combination of functionally active plastid FASII and cytosolic FASI has been known in *E. gracilis* since the early 1970s [127], indicating that this dual FASII/FASI system exists in photosynthetic secondary endosymbionts of the green lineage. In the red lineage, recent efforts to sequence the genomes of different *Nannochloropsis* species (e.g., *N. oceanica* [128]) have highlighted that, in addition to a plastid FASII, a cytosolic FASI-like protein also exists (e.g., CCMP1779 in *N. oceanica*). FASI enzymes are similar to animal FAS, but also close to polyketide synthases and it is not always straightforward to infer their function from primary structure [129]. To our knowledge, the activity harbored by the *Nannochloropsis* FASI-like enzyme has not yet been fully characterized. It has been speculated that FASI in *Nannochloropsis* catalyzes the production of shorter fatty acids (C14:0) as proposed in *Schizochytrium* [130], a heterotrophic species belonging to the Labyrinthulomycetes, phylogenetically related to the Eustigmatophytes within the Heterokonts.

The origin of the fatty acids used as precursors for glycerolipids can therefore be far more complicated in secondary endosymbionts compared to primary ones. The fate of fatty acids, from their neosynthesis to their incorporation into galactoglycerolipids, is therefore obscure in most of the species that have so far been analyzed. It is difficult to address the question of the import of eukaryotic diacyl-precursors, synthesized outside secondary plastids, for the following reasons: (i) the simple C18/C18 or C18/C16 definition initially stated might not hold true with the set of acyl transferases acting in a given species, and (ii) the presence of 4 membranes around secondary chloroplasts makes the presence

of an import system that would be homologous to that in the envelope of primary chloroplasts unlikely. It is therefore very difficult, based solely on the diacyl signature in glycerolipids, to infer the presence or absence of such a pathway. Metabolic labeling should thus be performed in each species of interest to assess the precise origin of precursors for plastid galactoglycerolipids. Nevertheless, regardless of this C16 and C18-based definition of eukaryotic molecular species, the large number of species accumulating x3/x6-VL-PUFAs in galactoglycerolipids, with C20 to C22 major molecular species, is striking [27,131,132], indicating that at least the omega pathway has been conserved.

4.3. The conservation of the omega pathway

In numerous secondary endosymbionts, the presence of x3/x6-VL-PUFAs (ARA, EPA, DHA) has been observed in galactoglycerolipids in both the green and the red lineages [27]. The highest level of EPA in MGDG and DGDG has been recently reported in the Chromerid *C. velia*, a close photosynthetic relative of Apicomplexa, with 70–80% EPA in MGDG and DGDG [86]. Based on genomic surveys, the synthesis of x3/x6-VL-PUFAs seems always to be catalyzed by cytosolic enzymes. The corresponding enzymes have been predicted in the sequenced genomes from the diatoms *T. pseudonana* [133] and *P. tricornutum* [134], and from the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp., e.g., *N. oceanica* [128]. Some of these enzymes have been functionally characterized, in particular in *P. tricornutum* and *T. pseudonana* [135–138]. In the Eustigmatophyte *Monodus subterraneus*, metabolic labeling experiments were performed using radiolabelled acetate or linoleic (C18:2) acid [139]. PC was mostly involved in the desaturation of C18 acyls, whereas PE and DGTS were substrates for further desaturations of C20 acyls, resulting in the accumulation of C20:5 (EPA) in these protists [139]. Metabolic labeling results were consistent with PE and DGTS providing EPA, either as free C20:5 or as C20:5/C20:5-DAG for the synthesis of MGDG in the chloroplast [139]. The route from the cytosolic production of x3/x6-VL-PUFAs to their plastidial incorporation in galactoglycerolipids has been further assessed experimentally in

Phaeodactylum [137] and *Nannochloropsis* [128]. The presence of an omega pathway, supplying the plastid with x3/x6-VL-PUFAs for galactoglycerolipids therefore seems to be one of the main features that has been conserved in secondary endosymbionts. As for the eukaryotic pathway in Angiosperms, it appears to have become the major provider of fatty acids for MGDG and DGDG in several species, whereas the prokaryotic route has assumed a minor role. This trend might be related to a better integration of plastid lipid synthases with extra-plastidial biosynthetic pathways. It might also highlight the importance of x3/x6-VL-PUFA specific functions.

4.4. Mapping galactolipid-synthesizing enzymes in the multiple membranes that delimit secondary plastids

Available genomic data indicate that secondary endosymbionts contain genes encoding eukaryotic MGDs and DGDs. In our surveys, we did not detect any orthologs of genes encoding cyanobacterial MGLcDG synthase or dgdA.

The question of the localization of MGD and DGD within the three to four membranes limiting secondary plastids has not been addressed experimentally, due to the lack of an accurate fractionation method for these organelles. The only secondary plastid that has been isolated to date is the apicoplast of *Plasmodium* [115], which does not contain any galactoglycerolipids (see below). The only secondary plastid in which galactoglycerolipids have been localized using anti-DGDG antibodies is from *Chromera* [86].

If we look more closely at the *P. tricornutum* example, we can predict three MGD genes. One of these (Phatr_14125) encodes a

protein harboring an unambiguous bipartite targeting sequence (signal peptide + chloroplast transit peptide) [140] consistent with its likely localization in the innermost membrane of the plastid. A second gene (Phatr_54168) encodes a protein with an N-terminal segment that shares some features of a bipartite targeting sequence. The third gene (Phatr_9619) encodes a protein whose sub-cellular localization cannot be predicted using available bioinformatic tools. These MGDs might be localized in different plastid membranes or possibly outside. The *P. tricornutum* genome is also predicted to contain three DGD genes, all having a longer N-terminal sequence than the angiosperm DGD2. One gene (Phatr_12884) encodes a protein with a bipartite targeting sequence, supporting a localization in the innermost membrane of the chloroplast. The two other genes (Phatr_11390 and Phatr_43116) have no known targeting sequences. They might be located in more peripheral membranes or even outside the plastid. Like in angiosperms, a Phatr_14125 (MGD1)/Phatr_12884 (DGD1) system might operate in the innermost membrane for the synthesis of thylakoids, whereas other combinations of enzymes might act in other locations for the expansion of specific membranes or to respond to some physiological or environmental contexts. The precise localization of these enzymes is therefore an important objective for future efforts, as are attempts to discover novel types of diatom targeting sequences [141].

4.5. Origin of MGDs and DGDs in Chromalveolates

The nuclear genomes of Chromalveolata contain genes deriving from the different actors of the secondary endosymbiosis, including the primary eukaryotic red alga and the secondary eukaryotic host. As mentioned above, a phylogenomic analysis of the diatom proteome using complete genome data from *Thalassiosira* and *Phaeodactylum* has allowed the identification of about 2500 genes likely derived from eukaryotic algae [48], with more than 70% of these genes being of green rather than red lineage provenance. These green genes seem to derive from an ancestor organism closely related to present-day Prasinophyta, e.g., *Micromonas* and *Ostreococcus*. The green gene contribution constitutes 16% of the diatom proteome and is also found in various Chromalveolata, including Apicomplexa and Haptophyta [48]. The occurrence of green genes together with genes inherited from the red algal endosymbiont seems to predate the split of Cryptophyta and Haptophyta from other Chromalveolata [48]. These conclusions have been recently reevaluated and the detection of green genes might have been overestimated due to a taxonomic sampling bias [142]. The detection of horizontal transfers of genes deriving from other actors than those strictly involved in the secondary endosymbiosis is reminiscent to the vast proportion of bacterial genes also found in primary endosymbiosis. In primary endosymbionts, MGD genes were thus shown to derive from Chloroflexi bacteria and the source of DGD genes is unknown.

A similar question can be raised about the red or green origin of MGD and DGD genes in Chromalveolata. In published phylogenetic analyses, MGD sequences from *Phaeodactylum*, *Thalassiosira* and *Aureococcus* are more closely related to the sequence from the Rhodophyta *Cyanidioschyzon*, than from *Ostreococcus* and *Micromonas*, supporting a red algal origin. Nevertheless, since we could not reproduce the bootstrap values of this study by reiterating the phylogenetic reconstruction, this origin should be reevaluated. A re-fined analysis of the DGD sequences should also be undergone to answer this question.

4.6. Loss of galactolipids in the secondary plastid of Apicomplexa

The apicoplast in Apicomplexa is a very specific case amongst secondary plastids, as it contains the smallest known plastid

circular DNA, with the most reduced genome [7,113,143–145]. This organelle has lost its photosynthetic capacity and no photo-synthetic genes have been detected. Significant efforts have focused on the search for galactoglycerolipids by metabolic labeling with radioactive precursors [146,147], immunostaining strategies [148] or whole parasite lipidomic analyses [148,149].

The search for MGD or DGD orthologs in Apicomplexa has also been inconclusive, although both *P. falciparum* and *T. gondii* genomes are now available [150,151]. The genome of *P. falciparum* is particularly difficult to mine, due to a strong nucleotide compositional bias [150,152,153]. Approximately half of the genes have been functionally annotated, due to improved bioinformatics tools [154]. Using the CAZy classification [69], no glycosyltransferase of the GT28 family and only one of the GT4 family, unrelated to DGD, could be identified in *Plasmodium*. In spite of the lack of these enzymes, it could not be excluded that galactoglycerolipids might be synthesized via the action of a non-homologous set of glycosyl-transferases in Apicomplexa.

Other groups of secondary endosymbionts also contain non-photosynthetic species. For instance, the non-photosynthetic diatom *N. alba* was shown to contain galactoglycerolipids [108]. Additional evidence for loss of galactoglycerolipids in the apicoplast was therefore required. Very recently, purification of the apicoplast from *P. falciparum* has been achieved [115]. This is actually the first report of the isolation of a secondary plastid. The method, based on immunopurification with magnetic beads, yielded sufficient amounts of purified organelle to perform an in-depth lipidomic analysis. No galactoglycerolipid could be detected, providing the first evidence for the absence of this landmark lipid of green and non-green plastids. Other lipids, such as sphingomyelin, ceramides and cholesterol, were detected and, along with most apicoplast structural lipids, were proposed to be generated and imported from the endomembranes, at least during this life stage [115]. As mentioned above, *C. velia*, a close relative of Apicomplexa, has large amounts of MGDG and DGDG [86] and its genome contains orthologs of MGD and DGD genes [86]. Bioinformatic predictions were confirmed by biochemical measurements and metabolic labeling [86]. Chromerida like *C. velia* and *Vitrella brassicaformis* [155] share a common photosynthetic ancestor with Apicomplexa. Comparative studies might therefore help us understand the evolutionary history of the galactoglycerolipid pathway in Apicomplexa in the context of the disappearance of photosynthesis combined with the dramatic simplification of the parasite's lipid metabolism.

5. Conclusion and perspectives

In conclusion, the evolution of galactoglycerolipid metabolism is marked by important transitions. In cyanobacteria, all species rely on a stepwise synthesis via a glucosyl intermediate, catalyzed by a MGLcDG synthase, incorporating glucose from UDP-Glc, an unknown epimerase converting glucose into galactose, and a dgdA-type DGDG synthase. As an exception to this rule, some cyanobacteria like *Gloeobacter* sp. have acquired a bacterial MGD enzyme by a recent horizontal transfer, enabling them to synthesize MGDG by direct incorporation of galactose.

In the conversion of a cyanobacterial endosymbiont into the primary plastid, the MGLcDG synthase/epimerase system was rapidly lost, and it can no longer be found in any present-day primary endosymbiont. On the other hand, a MGD gene from a Chloroflexi-like ancestor has been acquired by horizontal transfer. In some red algae living in acidic environments, the Cyanidiales, a DgdA-type DGDG synthase of cyanobacterial origin has been conserved, whereas in all other eukaryotes the synthesis of this lipid relies on DGD genes of unknown origin. The emergence of eukaryotic MGD and DGD enzymes is therefore not synchronous in all

phylogenetic groups. MGD and DGD are thus likely to have evolved by duplication and intense reorganization of N-terminal domains. Type A and B MGDG synthases have emerged in Spermatophyta, with Type A being dedicated to the production of lipids for thylakoids, and Type B operating mostly in non-green tissues and in response to some environmental stresses such as phosphate limitation. Pairs of MGD and DGD isoforms seem to act together, like MGD1/DGD1 and (MGD2;MGD3)/DGD2 in Arabidopsis. The evolution of primary endosymbionts seems to reflect an increasing level of integration with the lipid metabolism of the whole cell. In particular precursors for the synthesis of galactoglycerolipids seem to be more and more dependent on import from the cytosol, via the so-called eukaryotic pathway and/or the omega pathway.

With respect to the conversion from primary endosymbionts to secondary plastids, many important questions remain to be elucidated, in particular regarding the subcellular topology of MGD and DGD enzymes in the three to four membranes that bound secondary chloroplasts. Because secondary endosymbionts are not mono-phyletic, multiple scenarios can be envisaged. MGD and DGD genes seem to be conserved in all cases except Apicomplexa. Based on published phylogenetic studies, Chromalveolata MGD genes seem to derive from the red algal endosymbiont rather than from a cryptic Prasinophyta algal source. The origin of DGD genes in Chromalveolata remains to be established. The omega pathway feeding galactoglycerolipids with extraplastidial precursors has been conserved in numerous species. The machinery importing X3/X6-VL-PUFAs in the secondary chloroplast and the benefits for their high proportion of galactoglycerolipids are still unknown, and MGDG and DGDG have been lost in the apicoplast. How a plastid can be maintained without galactoglycerolipids is a major question for future research, and will require both the evolution of the up-stream plastidial biosynthesis of PA and the import of all other membrane components to be addressed. There is no doubt that the analysis of galactoglycerolipid pathways in complex plastids will be a fascinating subject of research in the next decade.

Acknowledgements

The authors were supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-BLAN-1524, ReGal; ANR-12-BIME-0005, DiaDomOil; ANR-12-JCJC, ChloroMitoLipid and ApicoLipid), ATIP-Avenir-FINO-VI (C.Y.B.), Région Rhône-Alpes, the Labex GRAL (Grenoble Alliance for Integrated Structural Cell Biology), Investissement d'Avenir OCEANOMICS, the EU-funded Diatomite and MicroB3 projects and the Australian Research Council.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2014.02.001>.

References

- Archibald JM, Keeling PJ. Recycled plastids: a 'green movement' in eukaryotic evolution. *Trends Genet* 2002;18:577–84.
- Kutschera U, Niklas KJ. Endosymbiosis, cell evolution, and speciation. *Theory Biosci* 2005;124:1–24.
- Gould SB, Waller RR, McFadden GI. Plastid evolution. *Annu Rev Plant Biol* 2008;59:491–517.
- Ginger ML, McFadden GI, Michels PAM. The evolution of organellar metabolism in unicellular eukaryotes Introduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010;365:693–8.
- Janouskovec J, Horak A, Obornik M, Lukes J, Keeling PJ. A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:10949–54.
- Lim L, McFadden GI. The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010;365:749–63.
- McFadden GI. Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr Opin Plant Biol* 1999;2:513–9.
- Falconet D. Origin, evolution and division of plastids. In: Eaton-Rye J, Tripathy B, Sharkey TD, editors. *Photosynthesis: plastid biology, energy conversion and carbon assimilation*. Springer Verlag; 2012. p. 35–61.
- Carter HE, McCluer RH, Slifer ED. Lipids of wheat flour. I. Characterization of galactosylglycerol components. *J Am Chem Soc* 1956;78:3735–8.
- Allen CF, Hirayama O, Good P. Lipid composition in photosynthetic systems. In: Goodwin TW, editor. *Biochemistry of chloroplasts*. London: Academic Press; 1966. p. 195–200.
- Moellering ER, Muthan B, Benning C. Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science* 2010;330:226–8.
- Moellering ER, Benning C. Galactoglycerolipid metabolism under stress: a time for remodeling. *Trends Plant Sci* 2011;16:98–107.
- Nichols BW. Separation of the lipids of photosynthetic tissues: improvements in analysis by thin-layer chromatography. *Biochim Biophys Acta* 1963;70:417–22.
- Allen CF, Good P, Davis HF, Chisum P, Fowler SD. Methodology for the separation of plant lipids and application to spinach leaf and chloroplast lamellae. *J Am Oil Chem Soc* 1966;43:223–31.
- Nichols BW, Harris RV, James AT. The lipid metabolism of blue-green algae. *Biochem Biophys Res Commun* 1965;20:256–62.
- Nichols BW. Light induced changes in the lipids of *Chlorella vulgaris*. *Biochim Biophys Acta* 1965;106:274–9.
- Safford R, Nichols BW. Positional distribution of fatty acids in monogalactosyl diglyceride fractions from leaves and algae – structural and metabolic studies. *Biochim Biophys Acta* 1970;210:57–64.
- Bloch K, Constantopoulos G, Kenyon C, Nagai J. Lipid metabolism in algae in the light and in the dark. In: Goodwin TW, editor. *Biochemistry of chloroplast*. New York: Academic Press; 1967. p. 195–211.
- Eichenberger W. Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions. *Phytochemistry* 1976;15:459–63.
- Nichols BW. The lipid of a moss (*Hypnum cupressiforme*) and of the leaves of green holly (*Ilex aquifolium*). *Phytochemistry* 1965;4:769–72.
- Sato N, Furuya M. The composition of lipids and fatty acids determined at various stages of haploid and diploid generations in the fern *Adiantum capillus veneris*. *Physiol Plantarum* 1984;62:139–47.
- Jamieson GR, Reid EH. Leaf lipids of some conifer species. *Phytochemistry* 1972;11:269–75.
- Allen CF, Good P, Davies HF, Foxler SD. Plant and chloroplast lipids. I-Separation and composition of major spinach lipids. *Biochem Biophys Res Commun* 1964;15:424–30.
- Constantopoulos G, Bloch K. Effect of light intensity on lipid composition of *Euglena gracilis*. *J Biol Chem* 1967;242:3538–42.
- Arao T, Kawaguchi A, Yamada M. Positional distribution of fatty-acids in lipids of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry* 1987;26:2573–6.
- Gounaris K, Barber J. Monogalactosyldiacylglycerol – the most abundant polar lipid in nature. *Trends Biochem Sci* 1983;8:378–81.
- Guschina IA, Harwood JL. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res* 2006;45:160–86.
- Boudière L, Michaud M, Petroutsos D, Rébellé F, Falconet D, Bastien O, et al. Glycerolipids in photosynthesis: composition, synthesis and trafficking. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 2014;1837:470–80.
- Mizusawa N, Wada H. The role of lipids in photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 2012;1817:194–208.
- Loll B, Kern J, Saenger W, Zouni A, Biesiadka J. Lipids in photosystem II: interactions with protein and cofactors. *Biochim Biophys Acta* 2007;1767:509–19.
- Schleiff E, Soll J, Kuchler M, Kuhlbrandt W, Harrer R. Characterization of the translocon of the outer envelope of chloroplasts. *J Cell Biol* 2003;160:541–51.
- Tjellstrom H, Andersson MX, Larsson KE, Sandelius AS. Membrane phospholipids as a phosphate reserve: the dynamic nature of phospholipid-to-digalactosyl diacylglycerol exchange in higher plants. *Plant Cell Environ* 2008;31:1388–98.
- Andersson MX, Larsson KE, Tjellstrom H, Liljenberg C, Sandelius AS. The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *J Biol Chem* 2005;280:27578–86.
- Jouhet J, Marechal E, Baldan B, Bigny R, Joyard J, Block MA. Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J Cell Biol* 2004;167:863–74.
- Jouhet J, Marechal E, Block MA. Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells. *Prog Lipid Res* 2007;46:37–55.
- Benning C. A role for lipid trafficking in chloroplast biogenesis. *Prog Lipid Res* 2008;47:381–9.
- Benning C. Mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2009;25:71–91.
- Shimajima M, Ohta H, Iwamatsu A, Masuda T, Shioi Y, Takamiya K. Cloning of the gene for monogalactosyldiacylglycerol synthase and its evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:333–7.
- Dormann P, Balbo I, Benning C. Arabidopsis galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1. *Science* 1999;284:2181–4.
- Awai K, Kakimoto T, Awai C, Kaneko T, Nakamura Y, Takamiya K, et al. Comparative genomic analysis revealed a gene for

- monogalactosyldiacylglycerol synthase, an enzyme for photosynthetic membrane lipid synthesis in cyanobacteria. *Plant Physiol* 2006;141:1120–7.
- [41] Awai K, Watanabe H, Benning C, Nishida I. Digalactosyldiacylglycerol is required for better photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC6803 under phosphate limitation. *Plant Cell Physiol* 2007;48:1517–23.
- [42] Sakurai I, Mizusawa N, Wada H, Sato N. Digalactosyldiacylglycerol is required for stabilization of the oxygen-evolving complex in photosystem II. *Plant Physiol* 2007;145:1361–70.
- [43] Parfrey LW, Barbero E, Lasser E, Dunthorn M, Bhattacharya D, Patterson DJ, et al. Evaluating support for the current classification of eukaryotic diversity. *PLoS Genet* 2006;2:e220.
- [44] Curtis BA, Tanifuji G, Burki F, Gruber A, Irimia M, Maruyama S, et al. Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature* 2012;492:59–65.
- [45] Keeling PJ. Chromalveolates and the evolution of plastids by secondary endosymbiosis. *J Eukaryot Microbiol* 2009;56:1–8.
- [46] Burki F, Shalchian-Tabrizi K, Pawlowski J. Phylogenomics reveals a new ‘megagroup’ including most photosynthetic eukaryotes. *Biol Lett* 2008;4:366–9.
- [47] Kim E, Graham LE. EEF2 analysis challenges the monophyly of Archaeplastida and Chromalveolata. *PLoS One* 2008;3:e2621.
- [48] Moustafa A, Beszteri B, Maier UG, Bowler C, Valentin K, Bhattacharya D. Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms. *Science* 2009;324:1724–6.
- [49] Brown AP, Slabas AR, Rafferty JB. Fatty acid biosynthesis in plants — metabolic pathways, structure and organization. In: Wada H, Murata N, editors. *Lipids in photosynthesis*. Dordrecht: Springer; 2010. p. 11–34.
- [50] Miege C, Marechal E. 1,2-sn-Diacylglycerol in plant cells: product, substrate and regulator. *Plant Physiol Biochem* 1999;37:795–808.
- [51] Dubots E, Botté C, Boudière L, Yamaryo-Botté Y, Jouhet J, Maréchal E, et al. Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis. *Biochimie* 2012;94:86–93.
- [52] Heinz E. Enzymatic reactions in galactolipid biosynthesis. In: Tevini M, Lichtenthaler HK, editors. *Lipids and lipid polymers*. Berlin: Springer-Verlag; 1977. p. 102–20.
- [53] Browse J, Warwick N, Somerville CR, Slack CR. Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the 16-3 plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* 1986;235:25–31.
- [54] Mongrand S, Bessoule JJ, Cabantous F, Cassagne C. The C16:3/C18:3 fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species. *Phytochemistry* 1998;49:1049–64.
- [55] Stanier RY, Cohen-Bazire G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu Rev Microbiol* 1977;31:225–74.
- [56] Murata N, Omata T. Isolation of cyanobacterial plasma membranes. *Methods Enzymol* 1988;167:245–51.
- [57] Lem NW, Stumpf PK. In vitro fatty acid synthesis and complex lipid metabolism in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*: I. Some characteristics of fatty acid synthesis. *Plant Physiol* 1984;74:134–8.
- [58] Stapleton SR, Jaworski JG. Characterization and purification of malonyl-coenzyme A – [Acyl-Carrier-Protein] transacylases from spinach and *Anabaena variabilis*. *Biochim Biophys Acta* 1984;794:240–8.
- [59] Stapleton SR, Jaworski JG. Characterization of fatty acid biosynthesis in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Biochim Biophys Acta* 1984;794:249–55.
- [60] Sato N, Murata N. Lipid biosynthesis in the blue-green alga (cyanobacterium), *Anabaena variabilis*. 3. UDP-glucose diacylglycerol glucosyltransferase activity in vitro. *Plant Cell Physiol* 1982;23:1115–20.
- [61] Sato N, Murata N. Lipid biosynthesis in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*. 2. Fatty acids and lipid molecular species. *Biochim Biophys Acta* 1982;710:279–89.
- [62] Sato N, Murata N. Lipid biosynthesis in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*. 1. Lipid classes. *Biochim Biophys Acta* 1982;710:271–8.
- [63] Omata T, Murata N. Glucolipid synthesis activities in cytoplasmic and thylakoid membranes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Plant Cell Physiol* 1986;27:485–90.
- [64] Yuzawa Y, Nishihara H, Haraguchi T, Masuda S, Shimojima M, Shimoyama A, et al. Phylogeny of galactolipid synthase homologs together with their enzymatic analyses revealed a possible origin and divergence time for photosynthetic membrane biogenesis. *DNA Res* 2012;19:91–102.
- [65] Matsumoto K, Okada M, Horikoshi Y, Matsuzaki H, Kishi T, Itaya M, et al. Cloning, sequencing, and disruption of the *Bacillus subtilis* psd gene coding for phosphatidylserine decarboxylase. *J Bacteriol* 1998;180:100–6.
- [66] Foht PJ, Tran QM, Lewis RN, McElhaney RN. Quantitation of the phase preferences of the major lipids of the *Acholeplasma laidlawii* B membrane. *Biochemistry* 1995;34:13811–7.
- [67] Jorasch P, Wolter FP, Zahringer U, Heinz E. A UDP glucosyltransferase from *Bacillus subtilis* successively transfers up to four glucose residues to 1,2-diacylglycerol: expression of yppP in *Escherichia coli* and structural analysis of its reaction products. *Mol Microbiol* 1998;29:419–30.
- [68] Berg S, Edman M, Li L, Wikstrom M, Wieslander A. Sequence properties of the 1,2-diacylglycerol 3-glucosyltransferase from *Acholeplasma laidlawii* membranes. Recognition of a large group of lipid glucosyltransferases in eubacteria and archaea. *J Biol Chem* 2001;276:22056–63.
- [69] Campbell JA, Davies GJ, Bulone V, Henrissat B. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glucosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 1997;326:929–39.
- [70] Holz G, Zahringer U, Warnecke D, Heinz E. Glycoengineering of cyanobacterial thylakoid membranes for future studies on the role of glycolipids in photosynthesis. *Plant Cell Physiol* 2005;46:1766–78.
- [71] Boudière L, Botte C, Saidani N, Lajoie M, Marion J, Bréhélin L, et al. Galvestine-1, a novel chemical probe for the study of the glycerolipid homeostasis system in plant cells. *Mol Biosyst* 2012;287:22367–76.
- [72] Suh MC, Schultz DJ, Ohlrogge JB. Isoforms of acyl carrier protein involved in seed-specific fatty acid synthesis. *Plant J* 1999;17:679–88.
- [73] Jouhet J, Dubots E, Maréchal E, Block MA. Lipid trafficking in plant photosynthetic cells. In: Wada H, Murata N, editors. *Lipids in photosynthesis*. Dordrecht: Springer; 2010. p. 349–72.
- [74] Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, et al. Acyl-lipid metabolism. The *Arabidopsis* book. Washington: The American Society of Plant Biologists; 2010. p. 1–65.
- [75] Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J, et al. Chloroplast proteomics highlights the subcellular compartmentation of lipid metabolism. *Prog Lipid Res* 2010;49:128–58.
- [76] Xu CC, Yu B, Cornish AJ, Froehlich JE, Benning C. Phosphatidylglycerol biosynthesis in chloroplasts of *Arabidopsis* mutants deficient in acyl-ACP glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Plant J* 2006;47:296–309.
- [77] Heinz E, Roughan PG. Similarities and differences in lipid metabolism of chloroplasts isolated from 18:3 and 16:3 plants. *Plant Physiol* 1983;72:273–9.
- [78] Ohlrogge J, Browse J. Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 1995;7:957–70.
- [79] Sato N, Tsuzuki M, Kawaguchi A. Glycerolipid synthesis in *Chlorella kessleri* 11h. I. Existence of a eukaryotic pathway. *Biochim Biophys Acta* 2003;1633:27–34.
- [80] Haigh WG, Yoder TF, Ericson L, Pratum T, Winget RR. The characterisation and cyclic production of a highly unsaturated homoserine lipid in *Chlorella minutissima*. *Biochim Biophys Acta* 1996;1299:183–90.
- [81] Khozin-Goldberg I, Yu HZ, Adlerstein D, Didi-Cohen S, Heimer YM, Cohen Z. Triacylglycerols of the red microalga *Porphyridium cruentum* can contribute to the biosynthesis of eukaryotic galactolipids. *Lipids* 2000;35:881–9.
- [82] Khozin I, Adlerstein D, Bigongo C, Heimer YM, Cohen Z. Elucidation of the biosynthesis of eicosapentaenoic acid in the microalga *Porphyridium cruentum* (II. Studies with radiolabeled precursors). *Plant Physiol* 1997;114:223–30.
- [83] Shiran D, Khozin I, Heimer YM, Cohen Z. Biosynthesis of eicosapentaenoic acid in the microalga *Porphyridium cruentum*. I: The use of externally supplied fatty acids. *Lipids* 1996;31:1277–82.
- [84] Mongrand S. De l’origine des lipides chloroplastiques eucaryotes – Distribution dans le règne végétal des lipides procaryotiques plastidiaux. Bordeaux: Université Victor Segalen; 1998.
- [85] Dubots E, Audry M, Yamaryo Y, Bastien O, Ohta H, Marechal E, et al. Activation of the chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase, MGD1, by phosphatidic acid and phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* 2010;285:11111–18.
- [86] Botte CY, Yamaryo-Boite Y, Janouskovec J, Rupasinghe T, Keeling PJ, Crellin P, et al. Identification of plant-like galactolipids in *Chromera velia*, a photosynthetic relative of malaria parasites. *J Biol Chem* 2011;286:29893–903.
- [87] Riekhof WR, Sears BB, Benning C. Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: discovery of the betaine lipid synthase BTA1(Cr). *Eukaryot Cell* 2005;4:242–52.
- [88] Masuda S, Harada J, Yokono M, Yuzawa Y, Shimojima M, Murofushi K, et al. A monogalactosyldiacylglycerol synthase found in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum* reveals important roles for galactolipids in photosynthesis. *Plant Cell* 2011;23:2644–58.
- [89] Suzuki K, Miyagishima SY. Eukaryotic and eubacterial contributions to the establishment of plastid proteome estimated by large-scale phylogenetic analyses. *Mol Biol Evol* 2010;27:581–90.
- [90] Price DC, Chan CX, Yoon HS, Yang EC, Qiu H, Weber AP, et al. Cyanophora paradoxa genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. *Science* 2012;335:843–7.
- [91] Miege C, Marechal E, Shimojima M, Awai K, Block MA, Ohta H, et al. Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. *Eur J Biochem* 1999;265:990–1001.
- [92] Awai K, Marechal E, Block MA, Brun D, Masuda T, Shimada H, et al. Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10960–5.
- [93] Marechal E, Block MA, Joyard J, Douce R. Purification of Udp-Galactose – 1,2-diacylglycerol galactosyltransferase from spinach chloroplast envelope membranes. *C R Acad Sci Paris* 1991;313:521–8.
- [94] Marechal E, Block MA, Joyard J, Douce R. Comparison of the kinetic properties of MGDG synthase in mixed micelles and in envelope membranes from spinach chloroplast. *FEBS Lett* 1994;352:307–10.
- [95] Marechal E, Block MA, Joyard J, Douce R. Kinetic properties of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. *J Biol Chem* 1994;269:5788–98.
- [96] Marechal E, Miege C, Block MA, Douce R, Joyard J. The catalytic site of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. Biochemical analysis of the structure and of the metal content. *J Biol Chem* 1995;270:5714–22.

- [97] Kobayashi K, Kondo M, Fukuda H, Nishimura M, Ohta H. Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:17216–21.
- [98] Kobayashi K, Fukuda H, Baba S, Kondo M, Nishimura M, Takamiya K, et al. Identification and characterization of a MGD1 knockout mutant in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 2006;47: S32–S32.
- [99] Kobayashi K, Awai K, Nakamura M, Nagatani A, Masuda T, Ohta H. Type-B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling, and are crucial for low-phosphate adaptation. *Plant J* 2009;57:322–31.
- [100] Kobayashi K, Awai K, Takamiya K, Ohta H. Arabidopsis type B monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation. *Plant Physiol* 2004;134:640–8.
- [101] Botte CY, Deligny M, Roccia A, Bonneau AL, Saidani N, Hardre H, et al. Chemical inhibitors of monogalactosyldiacylglycerol synthases in Arabidopsis thaliana. *Nat Chem Biol* 2011;7:834–42.
- [102] Nishiyama T, Fujita T, Shin IT, Seki M, Nishide H, Uchiyama I, et al. Comparative genomics of Physcomitrella patens gametophytic transcriptome and Arabidopsis thaliana: implication for land plant evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8007–12.
- [103] Ge C, Georgiev A, Ohman A, Wieslander A, Kelly AA. Tryptophan residues promote membrane association for a plant lipid glycosyltransferase involved in phosphate stress. *J Biol Chem* 2011;286:6669–84.
- [104] Kelly AA, Froehlich JE, Dormann P. Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes DGD1 and DGD2 in Arabidopsis reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis. *Plant Cell* 2003;15:2694–706.
- [105] Dormann P, Benning C. Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci* 2002;7:112–8.
- [106] Kobayashi K, Nakamura Y, Ohta H. Type A and type B monogalactosyldiacylglycerol synthases are spatially and functionally separated in the plastids of higher plants. *Plant Physiol Biochem* 2009;47:518–25.
- [107] Nakamura Y, Arimitsu H, Yamaryo Y, Awai K, Masuda T, Shimada H, et al. Digalactosyldiacylglycerol is a major glycolipid in floral organs of Petunia hybrida. *Lipids* 2003;38:1107–12.
- [108] Anderson R, Livermore BP, Kates M, Volcani BE. The lipid composition of the non-photosynthetic diatom Nitzschia alba. *Biochim Biophys Acta* 1978;528:77–88.
- [109] Schneider JC, Livne A, Sukenik A, Roessler PG. A mutant of Nannochloropsis deficient in eicosapentaenoic acid production. *Phytochemistry* 1995;40:807–14.
- [110] Schneider JC, Roessler P. Radiolabeling studies of lipids and fatty acids in Nannochloropsis (Eustigmatophyceae), an oleaginous marine alga. *J Phycol* 1994;30:594–8.
- [111] Gibbs SP. The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. *Ann N Y Acad Sci* 1981;361:193–208.
- [112] Kroth PG, Chiovitti A, Gruber A, Martin-Jezequel V, Mock T, Parker MS, et al. A model for carbohydrate metabolism in the diatom Phaeodactylum tricornutum deduced from comparative whole genome analysis. *PLoS One* 2008;3:e1426.
- [113] McFadden GI, Reith ME, Munholland J, Lang-Unnasch N. Plastid in human parasites. *Nature* 1996;381:482.
- [114] Kohler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJ, et al. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* 1997;275:1485–9.
- [115] Botte CY, Yamaryo-Botte Y, Rupasinghe TW, Mullin KA, MacRae JI, Spurck TP, et al. Atypical lipid composition in the purified relict plastid (apicoplast) of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:7506–11.
- [116] Cavalier-Smith T. Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003;358:109–33 [discussion 33–34].
- [117] Lang M, Apt KE, Kroth PG. Protein transport into “complex” diatom plastids utilizes two different targeting signals. *J Biol Chem* 1998;273:30973–8.
- [118] Bisanz C, Bastien O, Grando D, Jouhet J, Marechal E, Cesbron-Delauw MF. Toxoplasma gondii acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors. *Biochem J* 2006;394:197–205.
- [119] Mazumdar J, Wilson EH, Masek K, Christopher AH, Striepen B. Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in Toxoplasma gondii. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:13192–7.
- [120] Vaughan A, Vaughan AM, O’Neill MT, Tarun AS, Camargo N, Phuong TM, et al. Type II fatty acid synthesis is essential only for malaria parasite late liver stage development. *Cell Microbiol* 2009;14:506–20.
- [121] Yu M, Kumar TR, Nkrumah LJ, Coppi A, Retzlaff S, Li CD, et al. The fatty acid biosynthesis enzyme FabI plays a key role in the development of liver-stage malarial parasites. *Cell Host Microbe* 2008;9:567–78.
- [122] van Schaijk BC, Kumar TR, Vos MW, Richman A, van Gemert GJ, Li T, et al. Type II fatty acid biosynthesis is essential for Plasmodium falciparum sporozoite development in the midgut of Anopheles mosquitoes. *Eukaryot Cell* (in press).
- [123] Ramakrishnan S, Docampo MD, Macrae JI, Pujol FM, Brooks CF, van Dooren GG, et al. Apicoplast and endoplasmic reticulum cooperate in fatty acid biosynthesis in apicomplexan parasite Toxoplasma gondii. *J Biol Chem* 2012;287:4957–71.
- [124] Botte CY, Dubar F, McFadden GI, Marechal E, Biot C. Plasmodium falciparum apicoplast drugs: targets or off-targets? *Chem Rev* 2012;126:9–83.
- [125] Lindner SE, Sartain MJ, Hayes K, Harupa A, Moritz RL, Kappe SH, et al. Enzymes involved in plastid-targeted phosphatidic acid synthesis are essential for Plasmodium yoelii liver-stage development. *Mol Microbiol* 2014;10:1111–21.
- [126] Ramakrishnan S, Serricchio M, Striepen B, Butikofer P. Lipid synthesis in protozoan parasites: a comparison between kinetoplasts and apicomplexans. *Prog Lipid Res* 2013;52:488–512.
- [127] Goldberg I, Bloch K. Fatty acid synthetases in Euglena gracilis. *J Biol Chem* 1972;247:7349–57.
- [128] Vieler A, Wu G, Tsai CH, Bullard B, Comish AJ, Harvey C, et al. Genome, functional gene annotation, and nuclear transformation of the heterokont oleaginous alga Nannochloropsis oceanica CCMP1779. *PLoS Genet* 2012;8:e1003064.
- [129] Metz JG, Roessler P, Facciotti D, Levering C, Dittrich F, Lassner M, et al. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science* 2001;293:290–3.
- [130] Hauvermale A, Kuner J, Rosenzweig B, Guerra D, Diltz S, Metz JG. Fatty acid production in Schizochytrium sp.: involvement of a polyunsaturated fatty acid synthase and a type I fatty acid synthase. *Lipids* 2006;41:739–47.
- [131] Yongmanitchai W, Ward OP. Growth of and omega-3 fatty acid production by Phaeodactylum tricornutum under different culture conditions. *Appl Environ Microbiol* 1991;57:419–25.
- [132] Yongmanitchai W, Ward OP. Positional distribution of fatty acids, and molecular species of polar lipids, in the diatom Phaeodactylum tricornutum. *J Gen Microbiol* 1993;139:465–72.
- [133] Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, et al. The genome of the diatom Thalassiosira pseudonana: ecology, evolution, and metabolism. *Science* 2004;306:79–86.
- [134] Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, et al. The Phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 2008;456:239–44.
- [135] Domergue F, Abbadi A, Zahringer U, Moreau H, Heinz E. In vivo characterization of the first acyl-CoA Delta6-desaturase from a member of the plant kingdom, the microalga Ostreococcus tauri. *Biochem J* 2005;389:483–90.
- [136] Domergue F, Lerchl J, Zahringer U, Heinz E. Cloning and functional characterization of Phaeodactylum tricornutum front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis. *Eur J Biochem* 2002;269:4105–13.
- [137] Domergue F, Spiekermann P, Lerchl J, Beckmann C, Kilian O, Kroth PG, et al. New insight into Phaeodactylum tricornutum fatty acid metabolism. Cloning and functional characterization of plastidial and microsomal delta12-fatty acid desaturases. *Plant Physiol* 2003;131:1648–60.
- [138] Meyer A, Kirsch H, Domergue F, Abbadi A, Sperling P, Bauer J, et al. Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. *J Lipid Res* 2004;45:1899–909.
- [139] Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S, Shayakhmetova I, Cohen Z. Biosynthesis of eicosapentaenoic acid (EPA) in the freshwater eustigmatophyte Monodus subterraneus (Eustigmatophyceae). *J Phycol* 2002;38:745–56.
- [140] Apt KE, Zaslavkaia L, Lippmeier JC, Lang M, Kilian O, Wetherbee R, et al. In vivo characterization of diatom multipartite plastid targeting signals. *J Cell Sci* 2002;115:4061–9.
- [141] Kilian O, Kroth PG. Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids. *Plant J* 2005;41:175–83.
- [142] Deschamps P, Moreira D. Reevaluating the green contribution to diatom genomes. *Genome Biol Evol* 2012;4:683–8.
- [143] Marechal E, Cesbron-Delauw MF. The apicoplast: a new member of the plastid family. *Trends Plant Sci* 2001;6:200–5.
- [144] Fichera ME, Roos DS. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* 1997;390:407–9.
- [145] Dahl EL, Rosenthal PJ. Apicoplast translation, transcription and genome replication: targets for antimalarial antibiotics. *Trends Parasitol* 2008;24:279–84.
- [146] Marechal E, Azzouz N, de Macedo CS, Block MA, Feagin JE, Schwarz RT, et al. Synthesis of chloroplast galactolipids in apicomplexan parasites. *Eukaryot Cell* 2002;1:653–6.
- [147] Ramasamy R, Field MC. Terminal galactosylation of glycoconjugates in Plasmodium falciparum asexual blood stages and Trypanosoma brucei bloodstream trypomastigotes. *Exp Parasitol* 2012;130:314–20.
- [148] Botte C, Saidani N, Mondragon R, Mondragon M, Isaac G, Mui E, et al. Subcellular localization and dynamics of a digalactolipid-like epitope in Toxoplasma gondii. *J Lipid Res* 2008;49:746–62.
- [149] Welti R, Mui E, Sparks A, Wernimont S, Isaac G, Kirisits M, et al. Lipidomic analysis of Toxoplasma gondii reveals unusual polar lipids. *Biochemistry* 2007;46:13882–90.
- [150] Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature* 2002;419:498–511.
- [151] Aurecochea C, Barreto A, Brestelli J, Brunk BP, Cade S, Doherty R, et al. EuPathDB: the eukaryotic pathogen database. *Nucleic Acids Res* 2013;41:D684–91.

- [152] Bastien O, Roy S, Marechal E. Construction of non-symmetric substitution matrices derived from proteomes with biased amino acid distributions. *CR Biol* 2005;328:445–53.
- [153] Bastien O, Lespinats S, Roy S, Metayer K, Fertil B, Codani JJ, et al. Analysis of the compositional biases in *Plasmodium falciparum* genome and proteome using *Arabidopsis thaliana* as a reference. *Gene* 2004;336: 163–73.
- [154] Florent I, Marechal E, Gascuel O, Brehelin L. Bioinformatic strategies to provide functional clues to the unknown genes in *Plasmodium falciparum* genome. *Parasite* 2011;17:273–83.
- [155] Obornik M, Modry D, Lukes M, Cernotikova-Stribna E, Cihlar J, Tesarova M, et al. Morphology, ultrastructure and life cycle of *Vitrella brassicaformis* n. sp., n. gen., a novel chromerid from the Great Barrier Reef. *Protist* 2012;163:306–23.

Références

- Abrahamsen, M. S., Templeton, T. J., Enomoto, S., Abrahante, J. E., Zhu, G., Lancto, C. A., . Kapur, V. (2004). Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*, *304*(5669), 441-445.
doi:10.1126/science.1094786
- Alberge B, Gannoun-Zaki L, Bascunana C, Tran van Ba C, Vial H, Cerdan R (2010). Comparison of the cellular and biochemical properties of *Plasmodium falciparum* choline and ethanolamine kinases. *Biochem J*;425:149–58.
- Amiar, S., MacRae, J. I., Callahan, D. L., Dubois, D., van Dooren, G. G., Shears, M. J., . . . Botte, C. Y. (2016). Apicoplast-Localized Lysophosphatidic Acid Precursor Assembly Is Required for Bulk Phospholipid Synthesis in *Toxoplasma gondii* and Relies on an Algal/Plant-Like Glycerol 3-Phosphate Acyltransferase. *PLoS Pathog*, *12*(8), e1005765. doi:10.1371/journal.ppat.1005765
- Andenmatten, N., Egarter, S., Jackson, A. J., Jullien, N., Herman, J. P., & Meissner, M. (2013). Conditional genome engineering in *Toxoplasma gondii* uncovers alternative invasion mechanisms. *Nat Methods*, *10*(2), 125-127.
doi:10.1038/nmeth.2301
- Anthony, R. G., Khan, S., Costa, J., Pais, M. S., & Bogre, L. (2006). The Arabidopsis protein kinase PTI1-2 is activated by convergent phosphatidic acid and oxidative stress signaling pathways downstream of PDK1 and OXI1. *J Biol Chem*, *281*(49), 37536-37546. doi:10.1074/jbc.M607341200
- Antonescu, C. N., Danuser, G., & Schmid, S. L. (2010). Phosphatidic acid plays a regulatory role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell*, *21*(16), 2944-2952. doi:10.1091/mbc.E10-05-0421
- Awai, K., Xu, C., Tamot, B., & Benning, C. (2006). A phosphatidic acid-binding protein of the chloroplast inner envelope membrane involved in lipid trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(28), 10817-10822.
doi:10.1073/pnas.0602754103
- Bach, L., & Faure, J. D. (2010). Role of very-long-chain fatty acids in plant development, when chain length does matter. *C R Biol*, *333*(4), 361-370.
doi:10.1016/j.crvi.2010.01.014
- Banaszynski, L. A., Chen, L. C., Maynard-Smith, L. A., Ooi, A. G., & Wandless, T. J. (2006). A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. *Cell*, *126*(5), 995-1004.
doi:10.1016/j.cell.2006.07.025
- Banerjee, T., Jaijyan, D. K., Surolia, N., Singh, A. P., & Surolia, A. (2012). Apicoplast triose phosphate transporter (TPT) gene knockout is lethal for *Plasmodium*. *Mol Biochem Parasitol*, *186*(1), 44-50. doi:10.1016/j.molbiopara.2012.09.008
- Beck, J. R., Rodriguez-Fernandez, I. A., de Leon, J. C., Huynh, M. H., Carruthers, V. B., Morrissette, N. S., & Bradley, P. J. (2010). A novel family of *Toxoplasma* IMC proteins displays a hierarchical organization and functions in coordinating parasite division. *PLoS Pathog*, *6*(9), e1001094.
doi:10.1371/journal.ppat.1001094
- Benning, C. (2009). Mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *25*, 71-91.
doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113414
- Bertrams, M., & Heinz, E. (1981). Positional Specificity and Fatty Acid Selectivity of Purified sn-Glycerol 3-Phosphate Acyltransferases from Chloroplasts. *Plant Physiol*, *68*(3), 653-657.

- Besteiro, S., Bertrand-Michel, J., Lebrun, M., Vial, H., & Dubremetz, J. F. (2008). Lipidomic analysis of *Toxoplasma gondii* tachyzoites rhoptries: further insights into the role of cholesterol. *Biochem J*, *415*(1), 87-96. doi:10.1042/BJ20080795
- Besteiro, S., Dubremetz, J. F., & Lebrun, M. (2011). The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell Microbiol*, *13*(6), 797-805. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01597.x
- Besteiro, S., Michelin, A., Poncet, J., Dubremetz, J. F., & Lebrun, M. (2009). Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. *PLoS Pathog*, *5*(2), e1000309. doi:10.1371/journal.ppat.1000309
- Bisanz, C., Bastien, O., Grando, D., Jouhet, J., Marechal, E., & Cesbron-Delauw, M. F. (2006). *Toxoplasma gondii* acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors. *Biochem J*, *394*(Pt 1), 197-205. doi:10.1042/BJ20050609
- Blader, I. J., Coleman, B. I., Chen, C. T., & Gubbels, M. J. (2015). Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. *Annu Rev Microbiol*, *69*, 463-485. doi:10.1146/annurev-micro-091014-104100
- Blume, M., Rodriguez-Contreras, D., Landfear, S., Fleige, T., Soldati-Favre, D., Lucius, R., & Gupta, N. (2009). Host-derived glucose and its transporter in the obligate intracellular pathogen *Toxoplasma gondii* are dispensable by glutaminolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(31), 12998-13003. doi:10.1073/pnas.0903831106
- Borst, P., Overdulve, J. P., Weijers, P. J., Fase-Fowler, F., & Van den Berg, M. (1984). DNA circles with cruciforms from *Isospora* (*Toxoplasma*) *gondii*. *Biochim Biophys Acta*, *781*(1-2), 100-111.
- Botte, C. Y., Yamaro-Botte, Y., Rupasinghe, T. W., Mullin, K. A., MacRae, J. I., Spurck, T. P., . . . McFadden, G. I. (2013). Atypical lipid composition in the purified relict plastid (apicoplast) of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(18), 7506-7511. doi:10.1073/pnas.1301251110
- Bourgis, F., Kader, J. C., Barret, P., Renard, M., Robinson, D., Robinson, C., Roscoe, T. J. (1999). A plastidial lysophosphatidic acid acyltransferase from oilseed rape. *Plant Physiol*, *120*(3), 913-922.
- Bullen, H. E., Jia, Y., Yamaro-Botte, Y., Bisio, H., Zhang, O., Jemelin, N. K., . . . Soldati-Favre, D. (2016). Phosphatidic Acid-Mediated Signaling Regulates Microneme Secretion in *Toxoplasma*. *Cell Host Microbe*, *19*(3), 349-360. doi:10.1016/j.chom.2016.02.006
- Burger, K. N., Demel, R. A., Schmid, S. L., & de Kruijff, B. (2000). Dynamin is membrane-active: lipid insertion is induced by phosphoinositides and phosphatidic acid. *Biochemistry*, *39*(40), 12485-12493.
- Burger, K. N., Demel, R. A., Schmid, S. L., & de Kruijff, B. (2000). Dynamin is membrane-active: lipid insertion is induced by phosphoinositides and phosphatidic acid. *Biochemistry*, *39*(40), 12485-12493.
- Caballero, M. C., Pedroni, M. J., Palmer, G. H., Suarez, C. E., Davitt, C., & Lau, A. O. (2012). Characterization of acyl carrier protein and LytB in *Babesia bovis* apicoplast. *Mol Biochem Parasitol*, *181*(2), 125-133. doi:10.1016/j.molbiopara.2011.10.009
- Carruthers, V. B., & Sibley, L. D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol*, *73*(2), 114-123.

- Cassera, M. B., Gozzo, F. C., D'Alexandri, F. L., Merino, E. F., del Portillo, H. A., Peres, V. J., .Katzin, A. M. (2004). The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, 279(50), 51749-51759. doi:10.1074/jbc.M408360200
- Cazzolli, R., Shemon, A. N., Fang, M. Q., & Hughes, W. E. (2006). Phospholipid signalling through phospholipase D and phosphatidic acid. *IUBMB Life*, 58(8), 457-461. doi:10.1080/15216540600871142
- Charron, A. J., & Sibley, L. D. (2002). Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*, 115(Pt 15), 3049-3059.
- Chasserot-Golaz, S., Coorsen, J. R., Meunier, F. A., & Vitale, N. (2010). Lipid dynamics in exocytosis. *Cell Mol Neurobiol*, 30(8), 1335-1342. doi:10.1007/s10571-010-9577-x
- Chirala, S. S., & Wakil, S. J. (2004). Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids*, 39(11), 1045-1053.
- Clastre, M., Goubard, A., Prel, A., Mincheva, Z., Viaud-Massuart, M. C., Bout, D., .Laurent, F. (2007). The methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in coccidia: presence and sensitivity to fosmidomycin. *Exp Parasitol*, 116(4), 375-384. doi:10.1016/j.exppara.2007.02.002
- Cobbold, S. A., Vaughan, A. M., Lewis, I. A., Painter, H. J., Camargo, N., Perlman, D. H., . . . Llinas, M. (2013). Kinetic flux profiling elucidates two independent acetyl-CoA biosynthetic pathways in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, 288(51), 36338-36350. doi:10.1074/jbc.M113.503557
- Coleman, J. (1990). Characterization of *Escherichia coli* cells deficient in 1-acyl-sn-glycerol-3- phosphate acyltransferase activity. *J Biol Chem*, 265(28), 17215-17221.
- Coon, M., Ball, A., Pound, J., Ap, S., Hollenback, D., White, T., . . . Singer, J. W. (2003). Inhibition of lysophosphatidic acid acyltransferase beta disrupts proliferative and survival signals in normal cells and induces apoptosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther*, 2(10), 1067-1078.
- Cooper, C. L., Jackowski, S., & Rock, C. O. (1987). Fatty acid metabolism in sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase (plsB) mutants. *J Bacteriol*, 169(2), 605-611.
- Coppens, I., Dunn, J. D., Romano, J. D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J. C., & Joiner, K. A. (2006). *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell*, 125(2), 261-274. doi:10.1016/j.cell.2006.01.056
- Crawford, M. J., Thomsen-Zieger, N., Ray, M., Schachtner, J., Roos, D. S., & Seeber, F. (2006). *Toxoplasma gondii* scavenges host-derived lipoic acid despite its de novo synthesis in the apicoplast. *EMBO J*, 25(13), 3214-3222. doi:10.1038/sj.emboj.7601189
- Cronan, J. E., Jr., & Bell, R. M. (1974). Mutants of *Escherichia coli* defective in membrane phospholipid synthesis: mapping of sn-glycerol 3-phosphate acyltransferase Km mutants. *J Bacteriol*, 120(1), 227-233.
- Cyrille Botté, thèse, (2007) Etudes structurales, cellulaires et pharmacologiques de la synthèse des galactolipides chez *Arabidopsis thaliana* et *Toxoplasma gondii*
- Daily, J. P., Scandfeld, D., Pochet, N., Le Roch, K., Plouffe, D., Kamal, M., . . . Regev, A. (2007). Distinct physiological states of *Plasmodium falciparum* in malaria-infected patients. *Nature*, 450(7172), 1091-1095. doi:10.1038/nature06311
- Dechamps, S., Maynadier, M., Wein, S., Gannoun-Zaki, L., Marechal, E., & Vial, H. J. (2010a). Rodent and nonrodent malaria parasites differ in their phospholipid

- metabolic pathways. *J Lipid Res*, 51(1), 81-96. doi:10.1194/jlr.M900166-JLR200
- Dechamps, S., Wengelnik, K., Berry-Sterkers, L., Cerdan, R., Vial, H. J., & Gannoun-Zaki, L. (2010b). The Kennedy phospholipid biosynthesis pathways are refractory to genetic disruption in *Plasmodium berghei* and therefore appear essential in blood stages. *Mol Biochem Parasitol*, 173(2), 69-80. doi:10.1016/j.molbiopara.2010.05.006
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., . . . Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res*, 36(Web Server issue), W465-469. doi:10.1093/nar/gkn180
- Donald, R. G., & Roos, D. S. (1993). Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(24), 11703-11707.
- Dubey, J. P., Speer, C. A., & Lindsay, D. S. (1998). Isolation of a third species of *Sarcocystis* in immunodeficient mice fed feces from opossums (*Didelphis virginiana*) and its differentiation from *Sarcocystis falcatula* and *Sarcocystis neurona*. *J Parasitol*, 84(6), 1158-1164.
- Eidell, K. P., Burke, T., & Gubbels, M. J. (2010). Development of a screen to dissect *Toxoplasma gondii* egress. *Mol Biochem Parasitol*, 171(2), 97-103. doi:10.1016/j.molbiopara.2010.03.004
- Eidell, K. P., Burke, T., & Gubbels, M. J. (2010). Development of a screen to dissect *Toxoplasma gondii* egress. *Mol Biochem Parasitol*, 171(2), 97-103. doi:10.1016/j.molbiopara.2010.03.004
- Elabbadi, N., Ancelin, M. L., & Vial, H. J. (1997). Phospholipid metabolism of serine in *Plasmodium*-infected erythrocytes involves phosphatidylserine and direct serine decarboxylation. *Biochem J*, 324 (Pt 2), 435-445.
- Ferguson, D. J., Campbell, S. A., Henriquez, F. L., Phan, L., Mui, E., Richards, T. A., . . . Roberts, C. W. (2007). Enzymes of type II fatty acid synthesis and apicoplast differentiation and division in *Eimeria tenella*. *Int J Parasitol*, 37(1), 33-51. doi:10.1016/j.ijpara.2006.10.003
- Fichera, M. E., & Roos, D. S. (1997). A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature*, 390(6658), 407-409. doi:10.1038/37132
- Fleige, T., Fischer, K., Ferguson, D. J., Gross, U., & Bohne, W. (2007). Carbohydrate metabolism in the *Toxoplasma gondii* apicoplast: localization of three glycolytic isoenzymes, the single pyruvate dehydrogenase complex, and a plastid phosphate translocator. *Eukaryot Cell*, 6(6), 984-996. doi:10.1128/EC.00061-07
- Florin-Christensen, J., Suarez, C. E., Florin-Christensen, M., Hines, S. A., McElwain, T. F., & Palmer, G. H. (2000). Phosphatidylcholine formation is the predominant lipid biosynthetic event in the hemoparasite *Babesia bovis*. *Mol Biochem Parasitol*, 106(1), 147-156.
- Foster, D. A. (2010). Reduced mortality and moderate alcohol consumption: the phospholipase D-mTOR connection. *Cell Cycle*, 9(7), 1291-1294. doi:10.4161/cc.9.7.11145
- Foster, D. A. (2013). Phosphatidic acid and lipid-sensing by mTOR. *Trends Endocrinol Metab*, 24(6), 272-278. doi:10.1016/j.tem.2013.02.003
- Foth, B. J., Stimmler, L. M., Handman, E., Crabb, B. S., Hodder, A. N., & McFadden, G. I. (2005). The malaria parasite *Plasmodium falciparum* has only one pyruvate dehydrogenase complex, which is located in the apicoplast. *Mol Microbiol*, 55(1), 39-53. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04407.x

- Foussard, F., Gallois, Y., Girault, A., & Menez, J. F. (1991). Lipids and fatty acids of tachyzoites and purified pellicles of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*, 77(6), 475-477.
- Fouts, A. E., & Boothroyd, J. C. (2007). Infection with *Toxoplasma gondii* bradyzoites has a diminished impact on host transcript levels relative to tachyzoite infection. *Infect Immun*, 75(2), 634-642. doi:10.1128/IAI.01228-06
- Francia, M. E., & Striepen, B. (2014). Cell division in apicomplexan parasites. *Nat Rev Microbiol*, 12(2), 125-136. doi:10.1038/nrmicro3184
- Frentzen, M., Heinz, E., McKeon, T. A., & Stumpf, P. K. (1983). Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts. *Eur J Biochem*, 129(3), 629-636.
- Freundlich, J. S., Wang, F., Tsai, H. C., Kuo, M., Shieh, H. M., Anderson, J. W., . . . Sacchettini, J. C. (2007). X-ray structural analysis of Plasmodium falciparum enoyl acyl carrier protein reductase as a pathway toward the optimization of triclosan antimalarial efficacy. *J Biol Chem*, 282(35), 25436-25444.
- Fritzler, J. M., & Zhu, G. (2007). Functional characterization of the acyl-[acyl carrier protein] ligase in the *Cryptosporidium parvum* giant polyketide synthase. *Int J Parasitol*, 37(3-4), 307-316. doi:10.1016/j.ijpara.2006.10.014
- Gadir, N., Jackson, D. N., Lee, E., & Foster, D. A. (2008). Defective TGF-beta signaling sensitizes human cancer cells to rapamycin. *Oncogene*, 27(8), 1055-1062. doi:10.1038/sj.onc.1210721
- Gallois, Y., Foussard, F., Girault, A., Hodbert, J., Tricaud, A., Mauras, G., & Motta, C. (1988). Membrane fluidity of *Toxoplasma gondii*: a fluorescence polarization study. *Biol Cell*, 62(1), 11-15.
- Gallop, J. L., Butler, P. J., & McMahon, H. T. (2005). Endophilin and CtBP/BARS are not acyl transferases in endocytosis or Golgi fission. *Nature*, 438(7068), 675-678. doi:10.1038/nature04136
- Ganesan, S., Shabits, B. N., & Zaremborg, V. (2015). Tracking Diacylglycerol and Phosphatidic Acid Pools in Budding Yeast. *Lipid Insights*, 8(Suppl 1), 75-85. doi:10.4137/LPI.S31781
- Gangloff, Y. G., Mueller, M., Dann, S. G., Svoboda, P., Sticker, M., Spetz, J. F., . . . Kozma, S. C. (2004). Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Mol Cell Biol*, 24(21), 9508-9516. doi:10.1128/MCB.24.21.9508-9516.2004
- Gao, J., Wallis, J. G., & Browse, J. (2015). Mutations in the Prokaryotic Pathway Rescue the fatty acid biosynthesis1 Mutant in the Cold. *Plant Physiol*, 169(1), 442-452. doi:10.1104/pp.15.00931
- Gardner, M. J., Williamson, D. H., & Wilson, R. J. (1991). A circular DNA in malaria parasites encodes an RNA polymerase like that of prokaryotes and chloroplasts. *Mol Biochem Parasitol*, 44(1), 115-123.
- Gaskins, E., Gilk, S., DeVore, N., Mann, T., Ward, G., & Beckers, C. (2004). Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol*, 165(3), 383-393. doi:10.1083/jcb.200311137
- Gould, S. B., Kraft, L. G., van Dooren, G. G., Goodman, C. D., Ford, K. L., Cassin, A. M., . . . Waller, R. F. (2011). Ciliate pellicular proteome identifies novel protein families with characteristic repeat motifs that are common to alveolates. *Mol Biol Evol*, 28(3), 1319-1331. doi:10.1093/molbev/msq321
- Graindorge, A., Frenal, K., Jacot, D., Salamun, J., Marq, J. B., & Soldati-Favre, D. (2016). The Conoid Associated Motor MyoH Is Indispensable for *Toxoplasma*

- gondii Entry and Exit from Host Cells. *PLoS Pathog*, 12(1), e1005388. doi:10.1371/journal.ppat.1005388
- Gubbels, M. J., Vaishnav, S., Boot, N., Dubremetz, J. F., & Striepen, B. (2006). A MORN-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. *J Cell Sci*, 119(Pt 11), 2236-2245. doi:10.1242/jcs.02949
- Guertin, D. A., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. A., Kalaany, N. Y., Moffat, J., . . . Sabatini, D. M. (2006). Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell*, 11(6), 859-871. doi:10.1016/j.devcel.2006.10.007
- Guijas, C., Rodriguez, J. P., Rubio, J. M., Balboa, M. A., & Balsinde, J. (2014). Phospholipase A2 regulation of lipid droplet formation. *Biochim Biophys Acta*, 1841(12), 1661-1671. doi:10.1016/j.bbali.2014.10.004
- Harb, O. S., Chatterjee, B., Fraunholz, M. J., Crawford, M. J., Nishi, M., & Roos, D. S. (2004). Multiple functionally redundant signals mediate targeting to the apicoplast in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell*, 3(3), 663-674. doi:10.1128/EC.3.3.663-674.2004
- Harding, C. R., Egartner, S., Gow, M., Jimenez-Ruiz, E., Ferguson, D. J., & Meissner, M. (2016). Gliding Associated Proteins Play Essential Roles during the Formation of the Inner Membrane Complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog*, 12(2), e1005403. doi:10.1371/journal.ppat.1005403
- Hartmann, A., Hellmund, M., Lucius, R., Voelker, D. R., & Gupta, N. (2014). Phosphatidylethanolamine synthesis in the parasite mitochondrion is required for efficient growth but dispensable for survival of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*, 289(10), 6809-6824. doi:10.1074/jbc.M113.509406
- Haslam, T. M., Haslam, R., Thoraval, D., Pascal, S., Delude, C., Domergue, F., . . . Joubes, J. (2015). ECERIFERUM2-LIKE proteins have unique biochemical and physiological functions in very-long-chain fatty acid elongation. *Plant Physiol*, 167(3), 682-692. doi:10.1104/pp.114.253195
- He, C. Y., Shaw, M. K., Pletcher, C. H., Striepen, B., Tilney, L. G., & Roos, D. S. (2001). A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *EMBO J*, 20(3), 330-339. doi:10.1093/emboj/20.3.330
- Heath, R. J., & Rock, C. O. (1998). A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis. *J Bacteriol*, 180(6), 1425-1430.
- Heintzelman, M. B. (2015). Gliding motility in apicomplexan parasites. *Semin Cell Dev Biol*, 46, 135-142. doi:10.1016/j.semcd.2015.09.020
- Heinz, E. (1977). Enzymatic reactions in galactolipid biosynthesis. In Tevini M and Lichtenthaler HK (eds) *Lipids and Lipid Polymers*, Springer Verlag, Berlin. pp. 102-20.
- Hu, K. (2008). Organizational changes of the daughter basal complex during the parasite replication of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog*, 4(1), e10. doi:10.1371/journal.ppat.0040010
- Huang, P., Altshuler, Y. M., Hou, J. C., Pessin, J. E., & Frohman, M. A. (2005). Insulin-stimulated plasma membrane fusion of Glut4 glucose transporter-containing vesicles is regulated by phospholipase D1. *Mol Biol Cell*, 16(6), 2614-2623. doi:10.1091/mbc.E04-12-1124
- Huynh, M. H., & Carruthers, V. B. (2009). Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain lacking Ku80. *Eukaryot Cell*, 8(4), 530-539. doi:10.1128/EC.00358-08

- Jakobsson, A., Westerberg, R., & Jakobsson, A. (2006). Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res*, 45(3), 237-249. doi:10.1016/j.plipres.2006.01.004
- Jelenska, J., Crawford, M. J., Harb, O. S., Zuther, E., Haselkorn, R., Roos, D. S., & Gornicki, P. (2001). Subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(5), 2723-2728. doi:10.1073/pnas.051629998
- Jewett, T. J., & Sibley, L. D. (2003). Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Mol Cell*, 11(4), 885-894.
- Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., . . . Beck, E. (1999). Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science*, 285(5433), 1573-1576.
- Kafsack, B. F., Pena, J. D., Coppens, I., Ravindran, S., Boothroyd, J. C., & Carruthers, V. B. (2009). Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science*, 323(5913), 530-533. doi:10.1126/science.1165740
- Kall, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. L. (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol*, 338(5), 1027-1036. doi:10.1016/j.jmb.2004.03.016
- Kappe, S., Bruderer, T., Gantt, S., Fujioka, H., Nussenzweig, V., & Menard, R. (1999). Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *J Cell Biol*, 147(5), 937-944.
- Karnataki, A., Derocher, A., Coppens, I., Nash, C., Feagin, J. E., & Parsons, M. (2007). Cell cycle-regulated vesicular trafficking of *Toxoplasma* APT1, a protein localized to multiple apicoplast membranes. *Mol Microbiol*, 63(6), 1653-1668. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05619.x
- Katris, N. J., van Dooren, G. G., McMillan, P. J., Hanssen, E., Tilley, L., & Waller, R. F. (2014). The apical complex provides a regulated gateway for secretion of invasion factors in *Toxoplasma*. *PLoS Pathog*, 10(4), e1004074. doi:10.1371/journal.ppat.1004074
- Kihara, A. (2012). Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *J Biochem*, 152(5), 387-395. doi:10.1093/jb/mvs105
- Kim, H. U., & Huang, A. H. (2004). Plastid lysophosphatidyl acyltransferase is essential for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 134(3), 1206-1216. doi:10.1104/pp.103.035832
- Kim, K., & Weiss, L. M. (2004). *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol*, 34(3), 423-432. doi:10.1016/j.ijpara.2003.12.009
- Kohler, S. (2005). Multi-membrane-bound structures of Apicomplexa: I. the architecture of the *Toxoplasma gondii* apicoplast. *Parasitol Res*, 96(4), 258-272. doi:10.1007/s00436-005-1338-2
- Kooijman, E. E., Chupin, V., de Kruijff, B., & Burger, K. N. (2003). Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic*, 4(3), 162-174.
- Kooijman, E. E., Chupin, V., Fuller, N. L., Kozlov, M. M., de Kruijff, B., Burger, K. N., & Rand, P. R. (2005). Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry*, 44(6), 2097-2102. doi:10.1021/bi0478502
- Kunst, L., Browse, J., & Somerville, C. (1988). Altered regulation of lipid biosynthesis in a mutant of *Arabidopsis* deficient in chloroplast glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(12), 4143-4147.

- Lewin, T. M., Wang, P., & Coleman, R. A. (1999). Analysis of amino acid motifs diagnostic for the sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction. *Biochemistry*, *38*(18), 5764-5771. doi:10.1021/bi982805d
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Lopez, R. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res*, *43*(W1), W580-584. doi:10.1093/nar/gkv279
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M. X., Arondel, V., Bates, P. D., . . . Ohlrogge, J. (2010). Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book*, *8*, e0133. doi:10.1199/tab.0133
- Lindner, S. E., Sartain, M. J., Hayes, K., Harupa, A., Moritz, R. L., Kappe, S. H., & Vaughan, A. M. (2014). Enzymes involved in plastid-targeted phosphatidic acid synthesis are essential for Plasmodium yoelii liver-stage development. *Mol Microbiol*, *91*(4), 679-693. doi:10.1111/mmi.12485
- MacRae, J. I., Dixon, M. W., Dearnley, M. K., Chua, H. H., Chambers, J. M., Kenny, S., . . . McConville, M. J. (2013). Mitochondrial metabolism of sexual and asexual blood stages of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *BMC Biol*, *11*, 67. doi:10.1186/1741-7007-11-67
- Macrae, J. I., Lopaticki, S., Maier, A. G., Rupasinghe, T., Nahid, A., Cowman, A. F., & McConville, M. J. (2014). Plasmodium falciparum is dependent on de novo myo-inositol biosynthesis for assembly of GPI glycolipids and infectivity. *Mol Microbiol*, *91*(4), 762-776. doi:10.1111/mmi.12496
- MacRae, J. I., Marechal, E., Biot, C., & Botte, C. Y. (2012). The apicoplast: a key target to cure malaria. *Curr Pharm Des*, *18*(24), 3490-3504.
- Mann, T., & Beckers, C. (2001). Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite Toxoplasma gondii. *Mol Biochem Parasitol*, *115*(2), 257-268.
- Martins-Duarte, E. S., Carias, M., Vommaro, R., Surolia, N., & de Souza, W. (2016). Apicoplast fatty acid synthesis is essential for pellicle formation at the end of cytokinesis in Toxoplasma gondii. *J Cell Sci*, *129*(17), 3320-3331. doi:10.1242/jcs.185223
- Mazumdar, J., E, H. W., Masek, K., C, A. H., & Striepen, B. (2006). Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in Toxoplasma gondii. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(35), 13192-13197. doi:10.1073/pnas.0603391103
- McConkey, G. A., Rogers, M. J., & McCutchan, T. F. (1997). Inhibition of Plasmodium falciparum protein synthesis. Targeting the plastid-like organelle with thiostrepton. *J Biol Chem*, *272*(4), 2046-2049.
- McFadden, G. I. (2011). The apicoplast. *Protoplasma*, *248*(4), 641-650. doi:10.1007/s00709-010-0250-5
- McFadden, G. I., Reith, M. E., Munholland, J., & Lang-Unnasch, N. (1996). Plastid in human parasites. *Nature*, *381*(6582), 482. doi:10.1038/381482a0
- McLeod, R., Muench, S. P., Rafferty, J. B., Kyle, D. E., Mui, E. J., Kirisits, M. J., . . . Rice, D. W. (2001). Triclosan inhibits the growth of Plasmodium falciparum and Toxoplasma gondii by inhibition of apicomplexan Fab I. *Int J Parasitol*, *31*(2), 109-113.
- Meissner, M. et al. (2002) Role of Toxoplasma gondii myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science* *298*, 837-840
- Meissner, M., Brecht, S., Bujard, H., & Soldati, D. (2001). Modulation of myosin A expression by a newly established tetracycline repressor-based inducible system in Toxoplasma gondii. *Nucleic Acids Res*, *29*(22), E115

- Mercier, C., & Cesbron-Delauw, M. F. (2015). Toxoplasma secretory granules: one population or more? *Trends Parasitol*, *31*(2), 60-71. doi:10.1016/j.pt.2014.12.002
- Mital, J., Meissner, M., Soldati, D., & Ward, G. E. (2005). Conditional expression of Toxoplasma gondii apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion. *Mol Biol Cell*, *16*(9), 4341-4349. doi:10.1091/mbc.E05-04-0281
- Muller, F., & Frentzen, M. (2001). Phosphatidylglycerophosphate synthases from Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett*, *509*(2), 298-302.
- Muniz-Hernandez, S., Carmen, M. G., Mondragon, M., Mercier, C., Cesbron, M. F., Mondragon-Gonzalez, S. L., . . . Mondragon, R. (2011). Contribution of the residual body in the spatial organization of Toxoplasma gondii tachyzoites within the parasitophorous vacuole. *J Biomed Biotechnol*, *2011*, 473983. doi:10.1155/2011/473983
- Munnik, T., Meijer, H. J., Ter Riet, B., Hirt, H., Frank, W., Bartels, D., & Musgrave, A. (2000). Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant J*, *22*(2), 147-154.
- Naganuma, T., Sato, Y., Sassa, T., Ohno, Y., & Kihara, A. (2011). Biochemical characterization of the very long-chain fatty acid elongase ELOVL7. *FEBS Lett*, *585*(20), 3337-3341. doi:10.1016/j.febslet.2011.09.024
- Nagel, A., Prado, M., Heitmann, A., Tartz, S., Jacobs, T., Deschermeier, C., . . . Heussler, V. (2013). A new approach to generate a safe double-attenuated Plasmodium liver stage vaccine. *Int J Parasitol*, *43*(6), 503-514. doi:10.1016/j.ijpara.2013.01.010
- Nishida, I., Tasaka, Y., Shiraishi, H., & Murata, N. (1993). The gene and the RNA for the precursor to the plastid-located glycerol-3-phosphate acyltransferase of Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol*, *21*(2), 267-277.
- Oh, C. S., Toke, D. A., Mandala, S., & Martin, C. E. (1997). ELO2 and ELO3, homologues of the Saccharomyces cerevisiae ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J Biol Chem*, *272*(28), 17376-17384.
- Ohlrogge, J., & Browse, J. (1995). Lipid biosynthesis. *Plant Cell*, *7*(7), 957-970. doi:10.1105/tpc.7.7.957
- Ohno, Y., Suto, S., Yamanaka, M., Mizutani, Y., Mitsutake, S., Igarashi, Y., . . . Kihara, A. (2010). ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(43), 18439-18444. doi:10.1073/pnas.1005572107
- Opekarova, M., Robl, I., & Tanner, W. (2002). Phosphatidyl ethanolamine is essential for targeting the arginine transporter Can1p to the plasma membrane of yeast. *Biochim Biophys Acta*, *1564*(1), 9-13.
- Pei, Y., Tarun, A. S., Vaughan, A. M., Herman, R. W., Soliman, J. M., Erickson-Wayman, A., & Kappe, S. H. (2010). Plasmodium pyruvate dehydrogenase activity is only essential for the parasite's progression from liver infection to blood infection. *Mol Microbiol*, *75*(4), 957-971. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.07034.x
- Pino, P., Foth, B. J., Kwok, L. Y., Sheiner, L., Schepers, R., Soldati, T., & Soldati-Favre, D. (2007). Dual targeting of antioxidant and metabolic enzymes to the mitochondrion and the apicoplast of Toxoplasma gondii. *PLoS Pathog*, *3*(8), e115. doi:10.1371/journal.ppat.0030115

- Plattner, F., & Soldati-Favre, D. (2008). Hijacking of host cellular functions by the Apicomplexa. *Annu Rev Microbiol*, 62, 471-487. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162802
- Pleskot, R., Potocky, M., Pejchar, P., Linek, J., Bezvoda, R., Martinec, J., . . . Zarsky, V. (2010). Mutual regulation of plant phospholipase D and the actin cytoskeleton. *Plant J*, 62(3), 494-507. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04168.x
- Quittnat, F., Nishikawa, Y., Stedman, T. T., Voelker, D. R., Choi, J. Y., Zahn, M. M., . . . Coppens, I. (2004). On the biogenesis of lipid bodies in ancient eukaryotes: synthesis of triacylglycerols by a Toxoplasma DGAT1-related enzyme. *Mol Biochem Parasitol*, 138(1), 107-122. doi:10.1016/j.molbiopara.2004.08.004
- Ralph, S. A., van Dooren, G. G., Waller, R. F., Crawford, M. J., Fraunholz, M. J., Foth, B. J., . . . McFadden, G. I. (2004). Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the Plasmodium falciparum apicoplast. *Nat Rev Microbiol*, 2(3), 203-216. doi:10.1038/nrmicro843
- Ramakrishnan, S., Docampo, M. D., Macrae, J. I., Pujol, F. M., Brooks, C. F., van Dooren, G. G., . . . Striepen, B. (2012). Apicoplast and endoplasmic reticulum cooperate in fatty acid biosynthesis in apicomplexan parasite Toxoplasma gondii. *J Biol Chem*, 287(7), 4957-4971. doi:10.1074/jbc.M111.310144
- Ramakrishnan, S., Docampo, M. D., MacRae, J. I., Ralton, J. E., Rupasinghe, T., McConville, M. J., & Striepen, B. (2015). The intracellular parasite Toxoplasma gondii depends on the synthesis of long-chain and very long-chain unsaturated fatty acids not supplied by the host cell. *Mol Microbiol*, 97(1), 64-76. doi:10.1111/mmi.13010
- Ramakrishnan, S., Serricchio, M., Striepen, B., & Butikofer, P. (2013). Lipid synthesis in protozoan parasites: a comparison between kinetoplastids and apicomplexans. *Prog Lipid Res*, 52(4), 488-512. doi:10.1016/j.plipres.2013.06.003
- Robert-Gangneux, F., & Darde, M. L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*, 25(2), 264-296. doi:10.1128/CMR.05013-11
- Rock, C. O., & Jackowski, S. (2002). Forty years of bacterial fatty acid synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 292(5), 1155-1166. doi:10.1006/bbrc.2001.2022
- Rohrbough, J., & Broadie, K. (2005). Lipid regulation of the synaptic vesicle cycle. *Nat Rev Neurosci*, 6(2), 139-150. doi:10.1038/nrn1608
- Roiko, M. S., & Carruthers, V. B. (2009). New roles for perforins and proteases in apicomplexan egress. *Cell Microbiol*, 11(10), 1444-1452. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01357.x
- Roston, R. L., Gao, J., Murcha, M. W., Whelan, J., & Benning, C. (2012). TGD1, -2, and -3 proteins involved in lipid trafficking form ATP-binding cassette (ABC) transporter with multiple substrate-binding proteins. *J Biol Chem*, 287(25), 21406-21415. doi:10.1074/jbc.M112.370213
- Saito, T., Nishi, M., Lim, M. I., Wu, B., Maeda, T., Hashimoto, H., . . . Asai, T. (2008). A novel GDP-dependent pyruvate kinase isozyme from Toxoplasma gondii localizes to both the apicoplast and the mitochondrion. *J Biol Chem*, 283(20), 14041-14052. doi:10.1074/jbc.M709015200
- Sampels, V., Hartmann, A., Dietrich, I., Coppens, I., Sheiner, L., Striepen, B., . . . Gupta, N. (2012). Conditional mutagenesis of a novel choline kinase demonstrates plasticity of phosphatidylcholine biogenesis and gene expression in Toxoplasma gondii. *J Biol Chem*, 287(20), 16289-16299. doi:10.1074/jbc.M112.347138

- Sanchez, J. P., & Chua, N. H. (2001). Arabidopsis PLC1 is required for secondary responses to abscisic acid signals. *Plant Cell*, *13*(5), 1143-1154.
- Schlame, M., & Greenberg, M. L. (2016). Biosynthesis, remodeling and turnover of mitochondrial cardiolipin. *Biochim Biophys Acta*. doi:10.1016/j.bbalip.2016.08.010
- Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A. V., . . . Soling, H. D. (1999). Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature*, *401*(6749), 133-141. doi:10.1038/43613
- Schwartzman, J., Maffia, A., & et al. (1948). Congenital toxoplasmosis. *J Pediatr*, *33*(1), 66-73.
- Seeber, F., & Soldati-Favre, D. (2010). Metabolic pathways in the apicoplast of apicomplexa. *Int Rev Cell Mol Biol*, *281*, 161-228. doi:10.1016/S1937-6448(10)81005-6
- Seeber, F., Aliverti, A., & Zanetti, G. (2005). The plant-type ferredoxin-NADP+ reductase/ferredoxin redox system as a possible drug target against apicomplexan human parasites. *Curr Pharm Des*, *11*(24), 3159-3172.
- Seron, K., Dzierszynski, F., & Tomavo, S. (2000). Molecular cloning, functional complementation in *Saccharomyces cerevisiae* and enzymatic properties of phosphatidylinositol synthase from the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eur J Biochem*, *267*(22), 6571-6579.
- Serran-Aguilera, L., Denton, H., Rubio-Ruiz, B., Lopez-Gutierrez, B., Entrena, A., Izquierdo, L., . . . Hurtado-Guerrero, R. (2016). Plasmodium falciparum Choline Kinase Inhibition Leads to a Major Decrease in Phosphatidylethanolamine Causing Parasite Death. *Sci Rep*, *6*, 33189. doi:10.1038/srep33189
- Shanklin, J., & Cahoon, E. B. (1998). Desaturation and Related Modifications of Fatty Acids1. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, *49*, 611-641. doi:10.1146/annurev.arplant.49.1.611
- Shears, M. J., MacRae, J. I., Mollard, V., Goodman, C. D., Sturm, A., Orchard, L. M., . . . McFadden, G. I. (2016). Characterization of the Plasmodium falciparum and P. berghei glycerol 3-phosphate acyltransferase involved in FASII fatty acid utilization in the malaria parasite apicoplast. *Cell Microbiol*. doi:10.1111/cmi.12633
- Sheiner, L., Demerly, J. L., Poulsen, N., Beatty, W. L., Lucas, O., Behnke, M. S., . . . Striepen, B. (2011). A systematic screen to discover and analyze apicoplast proteins identifies a conserved and essential protein import factor. *PLoS Pathog*, *7*(12), e1002392. doi:10.1371/journal.ppat.1002392
- Shen, B., & Sibley, L. D. (2012). The moving junction, a key portal to host cell invasion by apicomplexan parasites. *Curr Opin Microbiol*, *15*(4), 449-455. doi:10.1016/j.mib.2012.02.007
- Shen, H., & Dowhan, W. (1996). Reduction of CDP-diacylglycerol synthase activity results in the excretion of inositol by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, *271*(46), 29043-29048.
- Shin, J. J., & Loewen, C. J. (2011). Putting the pH into phosphatidic acid signaling. *BMC Biol*, *9*, 85. doi:10.1186/1741-7007-9-85
- Shuji Yokoi, S.-I. H., Sachie Kishitani, Norio Murata & Kinya Toriyama. (1998). Introduction of the cDNA for Arabidopsis glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) confers unsaturation of fatty acids and chilling tolerance of photosynthesis on rice. *Molecular Breeding*, *4*(3), 269-275. doi:10.1023/A:1009671231614

- Sohlenkamp, C., & Geiger, O. (2016). Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol Rev*, 40(1), 133-159. doi:10.1093/femsre/fuv008
- Soldati D, B. J. (1993). Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science*, 260(5106), 349-352. doi:10.1126/science.8469986
- Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R., Birney, E., Bateman, A., & Durbin, R. (1998). Pfam: multiple sequence alignments and HMM-profiles of protein domains. *Nucleic Acids Res*, 26(1), 320-322.
- Splendore A. (1909). Sur un nouveau protozoaire du lapin, 2e note préliminaire *Bull Soc Path Exot*, 2, 462.
- Storm, J., & Muller, S. (2012). Lipoic acid metabolism of *Plasmodium*--a suitable drug target. *Curr Pharm Des*, 18(24), 3480-3489.
- Striepen, B., and Soldati, D. (2007) in *Toxoplasma gondii*, the Model Apicomplexan- Perspective and Methods (Weiss, L. D., and Kim, K., eds) pp.391– 415, Elsevier, London
- Surolia, N., & Surolia, A. (2001). Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of *Plasmodium falciparum*. *Nat Med*, 7(2), 167-173. doi:10.1038/84612
- Tawk, L., Chicanne, G., Dubremetz, J. F., Richard, V., Payrastre, B., Vial, H. J., . . . Wengelnik, K. (2010). Phosphatidylinositol 3-phosphate, an essential lipid in *Plasmodium*, localizes to the food vacuole membrane and the apicoplast. *Eukaryot Cell*, 9(10), 1519-1530. doi:10.1128/EC.00124-10
- Tawk, L., Dubremetz, J. F., Montcourrier, P., Chicanne, G., Merezegue, F., Richard, V., . . . Lebrun, M. (2011). Phosphatidylinositol 3-monophosphate is involved in *toxoplasma* apicoplast biogenesis. *PLoS Pathog*, 7(2), e1001286. doi:10.1371/journal.ppat.1001286
- Tenter, A. M., Heckerroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*, 30(12-13), 1217-1258.
- Testerink, C., & Munnik, T. (2011). Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *J Exp Bot*, 62(7), 2349-2361. doi:10.1093/jxb/err079
- Thomsen-Zieger, N., Schachtner, J., & Seeber, F. (2003). Apicomplexan parasites contain a single lipoic acid synthase located in the plastid. *FEBS Lett*, 547(1-3), 80-86.
- Tilley, M., Fichera, M. E., Jerome, M. E., Roos, D. S., & White, M. W. (1997). *Toxoplasma gondii* sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense-granule proteins. *Infect Immun*, 65(11), 4598-4605.
- Tilney, L. G., & Tilney, M. S. (1996). The cytoskeleton of protozoan parasites. *Curr Opin Cell Biol*, 8(1), 43-48.
- Tonkin, C. J., Roos, D. S., & McFadden, G. I. (2006). N-terminal positively charged amino acids, but not their exact position, are important for apicoplast transit peptide fidelity in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, 150(2), 192-200. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.08.001
- Toso, M. A., & Omoto, C. K. (2007). *Gregarina niphandrodes* may lack both a plastid genome and organelle. *J Eukaryot Microbiol*, 54(1), 66-72. doi:10.1111/j.1550-7408.2006.00229.x
- Tsirigos, K. D., Peters, C., Shu, N., Kall, L., & Eloffsson, A. (2015). The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic Acids Res*, 43(W1), W401-407. doi:10.1093/nar/gkv485

- Turnbull, A. P., Rafferty, J. B., Sedelnikova, S. E., Slabas, A. R., Schierer, T. P., Kroon, J. T., . . . Rice, D. W. (2001). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the glycerol-3-phosphate 1-acyltransferase from squash (*Cucurbita moschata*). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 57(Pt 3), 451-453.
- van den Elsen, L. W., Nusse, Y., Balvers, M., Redegeld, F. A., Knol, E. F., Garssen, J., & Willemsen, L. E. (2013). n-3 Long-chain PUFA reduce allergy-related mediator release by human mast cells in vitro via inhibition of reactive oxygen species. *Br J Nutr*, 109(10), 1821-1831. doi:10.1017/S0007114512003959
- van Dooren, G. G., Reiff, S. B., Tomova, C., Meissner, M., Humbel, B. M., & Striepen, B. (2009). A novel dynamin-related protein has been recruited for apicoplast fission in *Toxoplasma gondii*. *Curr Biol*, 19(4), 267-276. doi:10.1016/j.cub.2008.12.048
- van Dooren, G. G., Su, V., D'Ombra, M. C., & McFadden, G. I. (2002). Processing of an apicoplast leader sequence in *Plasmodium falciparum* and the identification of a putative leader cleavage enzyme. *J Biol Chem*, 277(26), 23612-23619. doi:10.1074/jbc.M201748200
- van Schaijk, B. C., Kumar, T. R., Vos, M. W., Richman, A., van Gemert, G. J., Li, T., . . . Vaughan, A. M. (2014). Type II fatty acid biosynthesis is essential for *Plasmodium falciparum* sporozoite development in the midgut of *Anopheles* mosquitoes. *Eukaryot Cell*, 13(5), 550-559. doi:10.1128/EC.00264-13
- van Schaijk, B. C., Kumar, T. R., Vos, M. W., Richman, A., van Gemert, G. J., Li, T., . . . Vaughan, A. M. (2014). Type II fatty acid biosynthesis is essential for *Plasmodium falciparum* sporozoite development in the midgut of *Anopheles* mosquitoes. *Eukaryot Cell*, 13(5), 550-559. doi:10.1128/EC.00264-13
- Vance, J. E., & Steenbergen, R. (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res*, 44(4), 207-234. doi:10.1016/j.plipres.2005.05.001
- Vaughan, A. M., O'Neill, M. T., Tarun, A. S., Camargo, N., Phuong, T. M., Aly, A. S., . . . Kappe, S. H. (2009). Type II fatty acid synthesis is essential only for malaria parasite late liver stage development. *Cell Microbiol*, 11(3), 506-520. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01270.x
- Vial, H. J., Eldin, P., Tielens, A. G., & van Hellemond, J. J. (2003). Phospholipids in parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol*, 126(2), 143-154.
- Vial, H. J., Thuet, M. J., & Philippot, J. R. (1984). Cholinephosphotransferase and ethanolaminephosphotransferase activities in *Plasmodium knowlesi*-infected erythrocytes. Their use as parasite-specific markers. *Biochim Biophys Acta*, 795(2), 372-383.
- Vigant, F., Santos, N. C., & Lee, B. (2015). Broad-spectrum antivirals against viral fusion. *Nat Rev Microbiol*, 13(7), 426-437. doi:10.1038/nrmicro3475
- Vossen, J. H., Abd-El-Haliem, A., Fradin, E. F., van den Berg, G. C., Ekengren, S. K., Meijer, H. J., . . . Joosten, M. H. (2010). Identification of tomato phosphatidylinositol-specific phospholipase-C (PI-PLC) family members and the role of PLC4 and PLC6 in HR and disease resistance. *Plant J*, 62(2), 224-239. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04136.x
- Waller, R. F., Keeling, P. J., Donald, R. G., Striepen, B., Handman, E., Lang-Unnasch, N., . . . McFadden, G. I. (1998). Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(21), 12352-12357.

- Waller, R. F., Reed, M. B., Cowman, A. F., & McFadden, G. I. (2000). Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway. *EMBO J*, *19*(8), 1794-1802. doi:10.1093/emboj/19.8.1794
- Wang, X., Devaiah, S. P., Zhang, W., & Welti, R. (2006). Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog Lipid Res*, *45*(3), 250-278. doi:10.1016/j.plipres.2006.01.005
- Wang, Z., Anderson, N. S., & Benning, C. (2013). The phosphatidic acid binding site of the Arabidopsis trigalactosyldiacylglycerol 4 (TGD4) protein required for lipid import into chloroplasts. *J Biol Chem*, *288*(7), 4763-4771. doi:10.1074/jbc.M112.438986
- Wang, Z., Xu, C., & Benning, C. (2012). TGD4 involved in endoplasmic reticulum-to-chloroplast lipid trafficking is a phosphatidic acid binding protein. *Plant J*, *70*(4), 614-623. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.04900.x
- Watts, J. L., & Browse, J. (2002). Genetic dissection of polyunsaturated fatty acid synthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(9), 5854-5859. doi:10.1073/pnas.092064799
- Weber, S., Wolter, F. P., Buck, F., Frentzen, M., & Heinz, E. (1991). Purification and cDNA sequencing of an oleate-selective acyl-ACP:sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase from pea chloroplasts. *Plant Mol Biol*, *17*(5), 1067-1076.
- Welti, R., Mui, E., Sparks, A., Wernimont, S., Isaac, G., Kirisits, M., McLeod, R. (2007). Lipidomic analysis of *Toxoplasma gondii* reveals unusual polar lipids. *Biochemistry*, *46*(48), 13882-13890. doi:10.1021/bi7011993
- Wengelnik, K., & Vial, H. J. (2007). Characterisation of the phosphatidylinositol synthase gene of *Plasmodium* species. *Res Microbiol*, *158*(1), 51-59. doi:10.1016/j.resmic.2006.11.005
- Wilson, R. J., & Williamson, D. H. (1997). Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Microbiol Mol Biol Rev*, *61*(1), 1-16.
- Wilson, R. J., Denny, P. W., Preiser, P. R., Rangachari, K., Roberts, K., Roy, A., . . . Williamson, D. H. (1996). Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol*, *261*(2), 155-172.
- Xu, C., Fan, J., Froehlich, J. E., Awai, K., & Benning, C. (2005). Mutation of the TGD1 chloroplast envelope protein affects phosphatidate metabolism in Arabidopsis. *Plant Cell*, *17*(11), 3094-3110. doi:10.1105/tpc.105.035592
- Xu, P., Widmer, G., Wang, Y., Ozaki, L. S., Alves, J. M., Serrano, M. G., . . . Buck, G. A. (2004). The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature*, *431*(7012), 1107-1112. doi:10.1038/nature02977
- Yamashita, A., Hayashi, Y., Matsumoto, N., Nemoto-Sasaki, Y., Oka, S., Tanikawa, T., & Sugiura, T. (2014). Glycerophosphate/Acylglycerophosphate acyltransferases. *Biology (Basel)*, *3*(4), 801-830. doi:10.3390/biology3040801
- Yamashita, A., Nakanishi, H., Suzuki, H., Kamata, R., Tanaka, K., Waku, K., & Sugiura, T. (2007). Topology of acyltransferase motifs and substrate specificity and accessibility in 1-acyl-sn-glycero-3-phosphate acyltransferase 1. *Biochim Biophys Acta*, *1771*(9), 1202-1215. doi:10.1016/j.bbalip.2007.07.002
- Yao, J., & Rock, C. O. (2013). Phosphatidic acid synthesis in bacteria. *Biochim Biophys Acta*, *1831*(3), 495-502. doi:10.1016/j.bbalip.2012.08.018
- Yeh, E., & DeRisi, J. L. (2011). Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol*, *9*(8), e1001138. doi:10.1371/journal.pbio.1001138

- Yu, B., Wakao, S., Fan, J., & Benning, C. (2004). Loss of plastidic lysophosphatidic acid acyltransferase causes embryo-lethality in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, *45*(5), 503-510.
- Yu, M., Kumar, T. R., Nkrumah, L. J., Coppi, A., Retzlaff, S., Li, C. D., . . . Fidock, D. A. (2008). The fatty acid biosynthesis enzyme FabI plays a key role in the development of liver-stage malarial parasites. *Cell Host Microbe*, *4*(6), 567-578. doi:10.1016/j.chom.2008.11.001
- Zhang, K., Bangs, J. D., & Beverley, S. M. (2010). Sphingolipids in parasitic protozoa. *Adv Exp Med Biol*, *688*, 238-248.
- Zhang, Q., Lin, F., Mao, T., Nie, J., Yan, M., Yuan, M., & Zhang, W. (2012). Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response to salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *24*(11), 4555-4576. doi:10.1105/tpc.112.104182
- Zhu, G. (2004). Current progress in the fatty acid metabolism in *Cryptosporidium parvum*. *J Eukaryot Microbiol*, *51*(4), 381-388.
- Zhu, G., Marchewka, M. J., & Keithly, J. S. (2000). *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology*, *146* (Pt 2), 315-321. doi:10.1099/00221287-146-2-315
- Zhu, S. Q., Zhao, H., Zhou, R., Ji, B. H., & Dan, X. Y. (2009). Substrate selectivity of glycerol-3-phosphate acyl transferase in rice. *J Integr Plant Biol*, *51*(11), 1040-1049. doi:10.1111/j.1744-7909.2009.00876

Curriculum vitae

Name Souad Amiar
Position PhD Student in Parasitology, Biochemistry and Molecular Biology
E-mail Souad.amiar@gmail.com
Address ApicoLipid Group
 IAB UMR5309 CNRS INSERM UGA
 Institut Jean Roget, Domaine de la Merci
 38700 La Tronche, FRANCE

Academic Qualification

April 2013-Present PhD Student in Parasitology
 Supervisor - Dr. C. Botté
 2012-2013 Diploma in Professional Integration
 2010-2012 Master Degree in Immunology, Microbiology and Infectious diseases
 University Grenoble Alpes 1, France
 2005-2010 Master Degree in Biotechnology and Plant Genomics (*First Class Honours*)
 University Mentouri Constantine, Algeria

Professional Experiences

April, 2013-Present PhD student: Study of phosphatidic acid synthesis in apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. ApicoLipid Team IAB UMR5309 CNRS INSERM-University Grenoble Alpes, France. Supervisor - Dr. C. Botté
 2012-2013 Internship: Genetic and biochemistry characterisation of PPRs proteins in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318 -AgroParisTech, Versailles-Grignon, France. Supervisor - Dr. H. Mireau
 2011-2012 Master Internship: Study of phosphatidic acid synthesis and study of an inducible knock down of *TgATS1* apicomplexan parasite *T.gondii*. Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, BIG, CEA / Laboratoire d'Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, CNRS UMR 5163, Grenoble, France. Supervisor - Dr. C. Botté
 2011 Master Internship: Study of lipid metabolism in apicoplast, apicoplast purification from *T. gondii* and study of lipid synthesis in *Chromera velia* plastid. Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, BIG, CEA / Laboratoire d'Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, CNRS UMR 5163, Grenoble, France. Supervisor - Dr. C. Botté
 2010 Master Internship: Implication of S6K1 and mTOR pathways in response to environmental factors in moss *Physcomitrella Patens*. Laboratoire de génétique et biophysique des plantes UMR7265, Aix Marseille. France. Supervisor –Dr. B. Menand

Honors and Prizes

2010-2011 Mobility Scholarship Averroes, Erasmus Mundus. University Mentouri Constantine, Algeria.

2014 Selected to participate to international competition “my PhD in 180 seconds” (ma these en 180 secondes): Grenoble final and Rhône-Alpes regional final, Universtiy Grenoble Alpes 1.

2015 Toxo13 Poster Presentation Prize, Gettysburg, USA

Skills

Research

Toxoplasma gondii: Molecular biology, transfection, Cell culture, immunofluorescence assay, Western blot, Southern blot, plaque assay, apicoplast purification, gene transient expression, lipid extraction, proliferation test, GC-MS data analysis.

Plasmodium falciparum: Cell culture, molecular biology.

Human cell: Cell culture.

Plant cell: RNA gel shift, cell culture, moss transfection.

Bacteria: Cloning, transformation, protein extraction, bacterial mutant complementation.

Bioinformatic: Serial Cloner, Snap Gene, Photoshop, Illustrator, ImageJ, Data bases:

Cosmoss. TAIR, ToxoDB, PlasmoDB, GeneBank, ClustalOmega, Phylogeny.

Publications

Souad Amiar, James I. MacRae, Damien L. Callahan, David Dubois, Giel G. van Dooren, Melanie J. Shears, , Marie-France Cesbron-Delauw, Eric Maréchal, Malcolm J. McConville, Geoffrey I. McFadden, Yoshiki Yamaryo-Botté, and Cyrille Y. Botté . *Apicoplast-localised lysophosphatidic acid precursor assembly is required for bulk phospholipid synthesis in Toxoplasma gondii and relies on a algal/plant-like glycerol 3-phosphate acyltransferase*. *Plos Pathogens*. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005765>

- Dimitris Petroutsos, **Souad Amiar**, Heni Abida, Lina-Juana Dolch, Olivier Bastien, Fabrice Rébeillé, Juliette Jouhet, Denis Falconet, Maryse A Block, Geoffrey I McFadden, Chris Bowler, Cyrille Botté, Eric Maréchal. *Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways - from cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids*. *Progress in lipid research* (2014).

[10.1016/j.plipres.2014.02.001](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.02.001)

- Nawel Haïli, Nadège Arnal, Martine Quadrado, **Souad Amiar**, Guillaume Tcherkez, Jennifer Dahan, Pierre Briozzo, Catherine Colas des Francs-Small, Nathalie Vrielynck, Hakim Mireau. *The pentatricopeptide repeat MTSF1 protein stabilizes the nad4 mRNA in Arabidopsis mitochondria*. *Nucleic Acids Research* (2013). [10.1093/nar/gkt337](https://doi.org/10.1093/nar/gkt337)

Talks

November, 15th 2016, 8th edition of Club Toxo, Paris, France.

Octobre, 23-26th 2016, GERLI: 12th international Lipidomics meeting: Microbe and Host Lipids, Toulouse, France.

- Octobre, 2nd-5th 2016**, Parafrap: 2nd biannual conference: From basic research to intervention strategies against parasites, Les Embiez Island, France.
- May 2015**, Annual EDCSV (Doctoral School of Chemistry and Life Sciences) PhD candidates meeting, Grenoble, France.
- Posters**
- 2015: 13th International congress on Toxoplasmosis "Toxo 13", Gettysburg, USA.**
Souad Amiar, Yoshiki Yamaryo-Botté, David Dubois, Eric Maréchal, Mohammed Ali Hakim and Cyrille Botté. Phosphatidic acid synthesis pathway in *Toxoplasma gondii* (**PhD poster Price**)
- 2013: 12th International congress on Toxoplasmosis "Toxo 12", Oxford, UK.**
Souad Amiar, Melanie J. Shears, Cordelia Bisanz, Yoshiki Yamaryo-Botté, Marie-France Delaw, Eric Marechal, Geoffrey I. McFadden and Cyrille Y. Botté. A Novel Phosphatidic Acid Synthesis Pathway in Apicoplast of Apicomplexan Parasites.
- 2012: 12th IMBL meeting, Lyon, France.**
Melanie J. Shears, Souad Amiar, Giel G. Van Dooren, Marie-France Cesbron-Delauw, Eric Maréchal, Geoffrey I. McFadden and Cyrille Y. Botté. A novel phosphatidic acid synthesis pathway in the apicoplast as a potential drug target.
- 2011: Gerli, Lyon, France.**
Souad Amiar, Giel VanDooren, Marie-France Cesbron-Delauw, Geoffrey McFadden, Eric Maréchal and Cyrille Botté. Role of lipidic biosynthesis in the apicoplast of Apicomplexa: Purification of the apicoplast of *Toxoplasma gondii*.
- Teaching**
- 2014-2016 Tutorial responsible in “Eukaryotic and Prokaryotic Genetics” and “Plant Physiology”
University Grenoble Alpes, France
- Other skills**
- 2014-2016 Info’thèse organizer for Master’s students
- 2015 Workshop "Autours du Cerveau" organizer “ : [Be the next “X-men”](#).”
- 2015-2016 [Glob’Alps PhD student association](#), active member.
- 2014-2015 [Glob’Alps PhD student association](#), [Coordinator](#) of scientific event.
- References**
- Cyrille Botté:** CR2-CNRS. Team leader « ApicoLipid ». IAB, Grenoble. Email: cyrille.botte@gmail.com. Phone : +33 (0)6 48 85 00 23.
- Mohamed Ali Hakimi:** CR1-INSERM. IAB, Grenoble. Email: mohamedali.hakimi@gmail.com. Phone : +33 (0)4 76 63 74 69.
- Eric Maréchal:** DR2-CNRS LPCV, Grenoble. Email : eric.marechal@cea.fr. Phone : +33 (0)4 38 78 49 85.
- Hakim Mireau :** CR-INRA Versailles-Grignon. Email : Hakim.Mireau@versailles.inra.fr. Phone : +33 (0)01 30 83 30 70.

Isabelle Tardieux : DR1-CNRS. IAB, Grenoble. Email : isabelle.tardieux@gmail.com.

Dominique Soldati-Favre: Professor, University of Geneva Medical School. Dominique.Soldati-Favre@unige.ch, Phone: +41 (0)22 379 56 72

Résumé

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire obligatoire, responsable de la toxoplasmose humaine. Ce parasite combine des voies de synthèse *de novo* essentielles ainsi que des mécanismes d'import massif des lipides de sa cellule hôte. Cette combinaison d'apports lipidiques unique est cruciale pour accumuler et générer une quantité suffisante d'éléments lipidiques nécessaires à la ségrégation des organites des cellules filles, la formation des nouvelles membranes filles et l'expansion de la membrane de la vacuole parasitophore dans laquelle se développe le parasite. Au cours de cette étude, de nouvelles voies métaboliques sont identifiées dans l'apicoplaste et relient la voie de synthèse des acides gras FASII et la synthèse en masse des lipides membranaires. Nous avons pu démontrer que l'apicoplaste possède une voie de synthèse des précurseurs membranaires, dont l'acide lysophosphatidique, essentiels à la synthèse de tous les lipides membranaires chez *T. gondii*. Les enzymes acyltransférases responsables de la synthèse de ces précurseurs sont TgATS1 et TgATS2 génèrent respectivement le LPA et le PA. Elles sont orthologues aux enzymes décrites dans les bactéries et le chloroplaste. Les modifications de ces enzymes et les analyses lipidiques par spectrométrie de masse, ont révélé le rôle prépondérant et l'implication de ces enzymes dans la synthèse des phospholipides membranaires à partir de l'acide gras C14:0 synthétisé *de novo* au niveau du plaste du parasite. La perte d'ATS1 tue le parasite en empêchant la formation et le développement de ses organites intracellulaires. La perte d'ATS2 n'est pas létale et elle est compensée par une augmentation de l'abondance des acides gras C16:0 et C18:0 probablement issus de la cellule hôte. Cette étude présente aussi des résultats préliminaires sur une voie de synthèse du PA dans le réticulum endoplasmique. Nos résultats suggèrent une importante collaboration entre l'apicoplaste et le réticulum endoplasmique pour la synthèse des lipides nécessaires pour le développement intracellulaire du parasite.

Mots clés : *Toxoplasma gondii*, apicoplaste, FASII, phospholipides, acyltransférases, biogenèse membranaire.

Abstract

Apicomplexa phylum includes a large number of obligate intracellular parasites responsible for important human and animal diseases, such as *Toxoplasma gondii*. This parasite depends on a large amount of lipids for its intracellular development within the host cell. These lipids are acquired by a combination of host lipid scavenging and *de novo* biosynthetic pathways. *T. gondii* is able to *de novo* synthesis of fatty acid *via* a prokaryotic FASII pathway in the apicoplast. Our recent work confirmed that the apicoplast harbours the first step of PA synthesis *via* a glycerol-3-phosphate acyltransferase (ATS1) to form the lysophosphatidic acid (LPA). This essential LPA can be exported from the apicoplast for the *de novo* bulk synthesis of phospholipids sustaining parasite membrane biogenesis. *T. gondii* genome encodes for two other acyltransferases named sn-acylglycerol 3-phosphate acyltransferases (AGPAT). AGPATs ensure the second step of PA synthesis using LPA. In this work we showed that these enzymes are localized in the Endoplasmic Reticulum and the apicoplast (AGPAT and ATS2, respectively). A genetic disruption of ATS2 affects parasite growth and normal cytokinesis. Lipidomic analysis using mass spectrometry combined to stable isotope labelling of ATS2-KO reveals an important reduction of lipids containing apicoplast-generated fatty acid C14:0. However, an increase of lipids containing C16 and C18 fatty acids was observed, suggesting a compensation of ATS2 loss by AGPAT activity in ER may be using host cell fatty acids. These data indicated an important collaboration between apicoplast and ER for lipid synthesis that involves massive lipid trafficking between the two organelles.

Key words: *Toxoplasma gondii*, apicoplast, prokaryotic fatty acid synthesis pathway FASII, phospholipids, acyltransferases, membrane biogenesis.