

Université de Strasbourg
Faculté de Médecine
Ecole Doctorale vie et santé

Année 2010

N°

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG
Sciences du vivant : Spécialité parasitologie

Altérations épigénétiques et rôle du facteur de transcription UHRF1 dans les cellules-hôtes infectées par *Toxoplasma gondii*

Présentée et soutenue par

Julie BRUNET

Le 18 juin 2010

Membres du Jury :

Dr Isabelle TARDIEUX	Rapporteur Externe
Dr Mohamed Ali HAKIMI	Rapporteur Externe
Pr Olivier ROHR	Examineur Interne
Pr Isabelle VILLENA	Examineur Externe

Directeurs de thèse :

Dr Marc MOUSLI	Directeur
Pr Ermanno CANDOLFI	Co-directeur

Remerciements

Je remercie mon directeur de thèse Monsieur le Docteur Marc Mousli pour avoir accepté de diriger ce travail. Vous m'avez donné la chance d'effectuer ce travail passionnant. Je vous adresse toute ma reconnaissance pour m'avoir guidé et exigé le meilleur de moi.

Je remercie mon co-directeur de thèse, Monsieur le Professeur Ermanno Candolfi, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et lui exprime toute ma reconnaissance pour avoir guidé ce travail. Merci pour votre soutien, vos encouragements, votre disponibilité et vos conseils scientifiques.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Madame le Docteur Isabelle Tardieux et Monsieur le Docteur Hakimi d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et d'avoir consacré de leur temps à la lecture, l'analyse et la critique de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je voudrais également remercier Madame le Professeur Villena et Monsieur le Professeur Rohr d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ma thèse. Veuillez bien accepter mes très sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde gratitude.

Je veux remercier Esterina, Elisabeth et Marie, à la fois pour votre soutien inconditionnel et votre collaboration active, mais aussi pour l'ambiance sympathique qui règne depuis le début de ma thèse au deuxième étage. Celles qui m'ont accompagnées durant les pauses café et mots croisés, les soirées restaurant, les week-ends à sillonner la France (merci aussi au chauffeur), les moments de joies et de découragements. Merci les filles, sans vous ces quelques années n'auraient assurément pas été les mêmes. Merci pour les corrections que vous avez apportées à ce manuscrit et de vous être attelées à une telle tâche !!

Je remercie Alexander, Jean-Paul Klein, Anne-lise, Cécile, Céline, Aziza, Ghaidaa et Sylvie pour leurs conseils et leur collaboration ainsi que leur disponibilité à l'égard de mes travaux.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe du laboratoire de parasitologie pour leur gentillesse, leur accueil et leur disponibilité.

J'aimerais également remercier Elody, Aurélie, Claire et Hélène bien que de l'autre côté du couloir vous faites partie intégrante de mes années labo. Merci pour votre bonne humeur et vos encouragements.

Je remercie le personnel de l'équipe de virologie pour leur accueil, leur disponibilité et leurs précieux conseils techniques.

Enfin, il y a les proches, ceux qui nous voient de l'extérieur et ne comprennent pas toujours très bien où l'on est, ni pourquoi.

A mes parents et ma famille qui m'ont accompagné durant cette période et m'ont soutenu dans les moments de doutes. Soyez remerciés de votre soutien et de votre patience. Avec toute mon affection.

Enfin, je tiens à remercier Charles pour son support inconditionnel. Merci de m'avoir toujours épaulé, d'être là à mes côtés et de me soutenir. Merci de partager ta vie avec moi. Même si je ne connais pas l'avenir, il n'existe pas sans toi.

Liste des abréviations

ABP : Actin-Binding Protein	GAPDH : Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
ADN : Acide DéoxyriboNucléique	GMPc : Guanosine Monophosphate cyclique
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments	GPI : Glycosylphosphoinositol
AMA1 : Apical Membrane Antigen 1	HAT : Histone Acetyl Transferase
AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique	HBx : Hepatitis B virus X protein
AP-1 : Activator Protein 1	HDAC : Histones Desacétylases
APAF1 : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1	HIF1 : Hypoxia Inductible Factor 1
ARN : Acide Ribonucléique	HOST : Host Organelle Sequestering Tubulo Structures
ARNm : Acide Ribonucléique messenger	HSP70 : Heat Shock Protein 70
ATP : Adénosine triphosphate	ICAM-1 : Intracellular Cell Adhesion Molecule 1
BET : Bromure d'éthidium	ICB2 : Inverted CCAAT box
BSA : Bovine Serum Albumine	ICBP90 : Inverted CCAAT box Binding Protein of 90 kDa
CAK : Cdk Activating Kinase	IDO : Indoléamine 2,3-dioxygénase
CAMLG : Calcium Modulating Ligand	IFN-γ : Interféron gamma
CDA1 : Cell Division Auto-antigen-1	IgG : Immunoglobuline G
Cdk : Cycline dépendante kinases	IGTP : GTPase interféron inductible
CDPK : Calcium-Dependent Protein Kinases	IκBα : Inhibitor of NF- κ B
ChIP : Chromatine Immunoprecipitation	IKK : I κ B Kinase
c-IAP : Cellular Inhibitors of Apoptosis	IL-12 : Interleukine 12
CKI : Cdk Inhibitor	iNOS : Oxyde Nitrique Synthétase inductible
CK2 : Casein Kinase 2	IRF-1 : Interferon Regulatory Factor 1
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	JAK : Janus Kinase
CREB : AMPc-Responsive Element-Binding protein	JM : Jonction Mobile
Da : Dalton	KO : Knock down
DAPI : 4,6- diamidino-2-phénylindole	LB : Lysogeny Broth
DEAE : Diethylaminoethyl-cellulose	LDL : Low-Density Lipoprotein
DHFR : Dehydrofolate Réductase	LINE : Long Interspersed Nuclear Element-1
dNTP : Désoxynucléotide tri-phosphate	LPS : Lipopolysaccharide
DISC : Death-Inducing Signaling Complex	Luc : Luciferase
DL : Dose Létale	MAPK : MAP kinase
Dnmt : DNA méthyltransférases	MCP1 : Monocyte Chimioattractant Protein 1
DO : Densité Optique	MVP : Membrane de la Vacuole Parasitophore
EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique	MTOC : Microtubular Organization Center
EGR1 et 2 : Early Growth Response	NF-κB : Nuclear factor- κ B
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay	NHDF : Normal Human Dermal Fibroblast
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases	NK : Natural Killer
FKHR1 : Forkhead transcription factor	NO : Monoxyde d'azote
FGF7 : Fibroblast Growth factor 7	NTPase : Nucléotide Triphosphate hydrolase

pb : paire de base
PBS : Phosphate Buffered Saline
PBST : PBS + Tween 20 à 0,05%
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR : Polymerase Chain Reaction
pH : Potentiel Hydrogène
PHD : Plant Homeo Domain
PI3K : Phosphoinositol 3 Kinase
PIP2 : Phosphatidylinositol-3-4 biphosphate
PIP3 : Phosphatidylinositol-3-4-5 triphosphate
PKA : Protein Kinase A
PKB : Protein Kinase B
PKD1 : Phosphoinositide-Dependant Kinase 1
PLP1 : Pore forming protein
PP2A : Protein Phosphatase 2 A
PP2C : Proteine Phosphatase 2C
pRB : Proteine of Retinoblastoma
PVDF : Polyvinylidene Fluoride
qsp : Quantité Suffisante Pour
RE : Réticulum Endoplasmique
RING : Really Interesting New Gene
ROS : Reactive Oxygen Species
RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SAG : Surface Antigen
SAHA : Suberoylanilide Hydroxamic Acid

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SEM : Standard Error of the Mean
SiRNA : Small interference RNA
SLN : Séquences de Localisation Nucléaire
SRA : Set and Ring Associated domain
SRS : SAG-Related Sequences
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription
SUSA : SAG-unrelated antigens
TGF- β : Transforming Growth Factor-beta
Th1 : T helper de type 1
TLR : Toll-like Receptors
TNFR : Récepteur du TNF- α
TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha
TopoII α : Topoisomérase II α
TRAF1 : TNF-Receptor-Associated Factors 1
TTD : Tandem Tudor Domain
UHRF1 : Ubiquitin-like containing PHD and Ring Finger domains, 1
UV : Ultra-Violet
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIR : Virulent loci
VP : Vacuole Parasitophore
Vpr : Protéine R du VIH
WT : Wild Type

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	4
SOMMAIRE	6
INTRODUCTION	11
A- <i>Toxoplasma gondii</i> et la toxoplasmose	13
I. <i>Toxoplasma gondii</i>	13
I.1. Stades parasitaires	13
I.2. Organisation moléculaire	18
I.2.1. Protéines de surface	19
I.2.2. Micronèmes	19
I.2.3. Rhoptries	19
I.2.4. Granules denses	21
I.3. Génotype et virulence	22
I.4. Invasion de la cellule-hôte	23
I.5. Cycle parasitaire	27
II. La toxoplasmose	29
II.1. Epidémiologie	29
II.2. Manifestations physiopathologiques	30
II.2.1. La toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent	30
II.2.2. La toxoplasmose de l'immunodéprimé	31
II.2.3. La toxoplasmose congénitale	32
II.2.4. La toxoplasmose oculaire	33
II.2.5. Problèmes vétérinaires	34
II.3. Traitements et prophylaxie	34
B- Communication entre le parasite et la cellule-hôte	36
I. La membrane de la vacuole parasitophore : organelle unique et dynamique	37
II. Acquisition des nutriments	38
III. Manipulation du cytosquelette et des organelles de la cellule-hôte	41
III.1. Recrutement des mitochondries et du réticulum endoplasmique de la cellule-hôte	41
III.2. Réorganisation du cytosquelette et capture des lysosomes	44
IV. Modification des voies de signalisation de l'apoptose	47
IV.1. Manipulation de la voie apoptotique extrinsèque par <i>T. gondii</i>	48
IV.2. Manipulation de la voie apoptotique intrinsèque par <i>T. gondii</i>	48
IV.3. Rôle de la voie impliquant NF- κ B	49

IV.4. Rôle de la voie des PI3 kinases	49
V. Manipulation des facteurs de transcription	51
V.1. NF-κB	51
V.2. STAT	55
V.2.1. STAT1	55
V.2.2. STAT3 et STAT6	57
V.3. HIF1	58
V.4. EGR2	59
VI. Manipulation du système immunitaire de la cellule-hôte	60
VII. <i>T. gondii</i> cible la modification des histones pour inactiver certains gènes	61
VIII. Impact du génotype et des protéines de roptries de <i>Toxoplasma gondii</i> sur les interactions hôte-parasite	65
VIII.1. Modulation des facteurs de transcription STAT3 et NF-κB en fonction de la souche parasitaire	65
VIII.1.1. STAT3	65
VIII.1.2. NF-κB	66
VIII.2. Implication de ROP16 et ROP18 dans la modulation des voies de signalisation de la cellule-hôte et la virulence	67
IX. Le noyau : nouvelle destination pour des protéines effectrices parasitaires	68
Conclusion	70
C- Le facteur de transcription UHRF1	71
I. Caractéristiques structurales d'UHRF1	71
I.1. La protéine UHRF1	71
I.2. Le gène <i>uhrf1</i>	72
II. Expression d'UHRF1	73
III. Fonctions du facteur de transcription UHRF1	74
III.1. UHRF1 et son rôle dans la régulation du cycle cellulaire	74
III.1.1. Généralités sur le cycle cellulaire	74
III.1.2. Contrôle du cycle cellulaire par le facteur de transcription UHRF1	76
III.2. Implication d'UHRF1 dans différents cancers	78
III.2.1. Rôle d'UHRF1 dans le cancer	78
III.2.2. UHRF1, nouvelle cible thérapeutique dans le traitement des cancers ?	80
III.3. UHRF1 est associé à des nombreuses modifications épigénétiques	82
III.3.1. Généralités sur les altérations épigénétiques	82
III.3.1.1. La méthylation de l'ADN	83
III.3.1.2. Modifications des histones	84
III.3.2. UHRF1 et méthylation de l'ADN	85
III.3.3. UHRF1 et modification des histones	90

III.3.4.	UHRF1, élément central dans les interactions épigénétiques (interconnexion entre la méthylation de l'ADN et la modification des histones).	91
OBJECTIFS		94
RESULTATS ET DISCUSSION		96
Partie I : Rôle d'UHRF1 dans la régulation du cycle cellulaire des cellules-hôtes infectées et son influence dans la prolifération intracellulaire de <i>T. gondii</i>		98
I.	L'infection par <i>T. gondii</i> induit une dérégulation du cycle cellulaire de la cellule-hôte infectée	98
I.1.	<i>T. gondii</i> induit un arrêt de prolifération ainsi qu'un arrêt en phase G2/M du cycle cellulaire des cellules infectées	100
I.2.	Profils d'expression des protéines régulatrices du cycle cellulaire en réponse à l'infection	101
II.	UHRF1 est requis pour la prolifération intracellulaire de <i>T. gondii</i>	107
Article 1 : <i>Toxoplasma gondii</i> exploite UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation		111
Partie II : Mécanismes de régulation du gène de la <i>cycline B</i> dans les cellules infectées et altérations épigénétiques induites par l'infection		114
I.	Résultats	114
I.1.	<i>T. gondii</i> exploite UHRF1 pour supprimer l'expression de la cycline B	114
I.2.	Altérations épigénétiques induites par l'infection	117
I.2.1.	Modulation de l'expression des DNA methyltransferases lors de l'infection	118
I.2.2.	Induction d'une hyperméthylation du génome de la cellule-hôte par <i>T. gondii</i>	119
I.2.3.	Altérations épigénétiques impliquées dans la régulation du cycle cellulaire des cellules infectées par <i>T. gondii</i>	120
I.2.4.	Liaison d'UHRF1 aux CCAAT box du promoteur du gène de la <i>cycline B</i>	121
II.	Conclusion	123
Partie III : Modulation de l'expression d'UHRF1 dans les cellules infectées par <i>T. gondii</i>		126
I.	Régulation de l'expression d'UHRF1 par NF-κB lors de l'infection par <i>T. gondii</i>	127
I.1.	NF-κB se lie au promoteur du gène <i>uhrf1</i> dans les cellules infectées	127
I.2.	Modulation de l'activité promotrice du gène <i>uhrf1</i> par NF-κB dans les cellules infectées	128
I.3.	Conclusion et Perspectives	129
II.	Implication de ROP16 dans la modulation de l'expression d'UHRF1	130
II.1.	Modification post-traductionnelle de la protéine UHRF1 lors de l'infection	130
II.2.	Implication des roptries dans l'activation du facteur de transcription UHRF1	131
II.3.	Conclusion et Perspectives	132

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	136
MATERIEL ET METHODES	146
I. Culture cellulaire	146
II. Culture <i>in vivo</i> de <i>T. gondii</i>	146
III. Traitements chimiques	146
IV. Anticorps et produits chimiques	147
V. Préparation des plasmides et souches bactériennes	148
VI. Cytométrie en flux	149
VII. Western blot et co-immunoprécipitation	150
VIII. Transfection	150
IX. Immunofluorescence	151
X. PCR quantitative et analyse par RT-PCR	152
XI. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)	153
XII. Analyse de la méthylation	154
XIII. Luciférase	154
XIV. Analyse statistique	155
LISTE DES FIGURES	156
LISTE DES TABLEAUX	159
BIBLIOGRAPHIE	160

INTRODUCTION

T. gondii est un parasite intracellulaire obligatoire appartenant au phylum des Apicomplexae, phylum qui inclut un grand nombre de parasites humains et animaux responsables de pathologies telles que le paludisme, la toxoplasmose, les coccidioses ou les cryptosporidioses. On le retrouve dans le monde entier, à une prévalence élevée et dans un éventail exceptionnellement large d'hôtes, ce qui en fait un des parasites protozoaires les plus prospères du monde. Ce pathogène est un des plus communs chez l'homme et cela pour plusieurs raisons : son cycle de développement complexe lui permet d'être transmis à la fois lors de son cycle sexué par les matières fécales de félinés et asexué par le carnivorisme ; *Toxoplasma* a un large tropisme de cellules-hôtes qui inclut la plupart des cellules nucléées ; il se développe en une infection chronique qui ne peut être éliminée par le système immunitaire de l'hôte et par les médicaments. Ceci permet au parasite d'atteindre des taux d'infection allant de 23 % aux USA à 50 % en France (Jones *et al.*, 2001, Tenter *et al.*, 2000). C'est l'une des infections les plus fréquentes dans la population française et on estime que 200 000 à 300 000 nouvelles infections surviennent chaque année dont 15 à 20% sont symptomatiques (rapport AFSSA 2005). Généralement bénigne chez les individus immunocompétents, elle peut être grave dans deux cas : la toxoplasmose congénitale et lors de la réactivation de kystes entraînant des nécroses hépatiques, cérébrales ou oculaires. En médecine vétérinaire, la toxoplasmose est à l'origine de nombreux avortements dans les élevages et représente donc un impact économique important.

Les études menées sur ce parasite sont incitées pour deux raisons principales. Premièrement, le parasite entraîne des pathologies graves (encéphalites, chorioretinites, myocardites) et les médicaments actuels sont inefficaces contre les infections chroniques. De plus, des résistances à certains médicaments ont été rapportées. Deuxièmement, *Toxoplasma* est utilisé comme un modèle d'étude (facilement isolé, cultivé et génétiquement modifié) pour d'autres pathologies causées par des Apicomplexae comme *Plasmodium*, agent du paludisme, *Eimeria* qui cause des coccidioses chez la volaille et *Cryptosporidium*, infection opportuniste importante chez les patients atteints du VIH.

T. gondii persiste dans certains organes immunologiquement privilégiés comme le cerveau ou l'œil (Black and Boothroyd, 2000). La persistance du parasite n'est permise que parce que le parasite exploite la cellule-hôte à son avantage et interfère avec de nombreuses voies de signalisation de cette cellule afin d'assurer sa survie et sa prolifération. Afin d'identifier les voies de signalisation altérées par le parasite, les premières approches ont été effectuées par

micro-arrays (Blader *et al.*, 2001, Gail *et al.*, 2001). Plus de mille gènes se sont avérés être régulés négativement ou positivement par le parasite. Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans l'apoptose, l'inflammation, la prolifération cellulaire...Le parasite manipule la cellule-hôte à plusieurs niveaux lui permettant de contourner la réponse immunitaire, d'assurer la survie des cellules infectées et d'acquérir les nutriments pour lesquels il est auxotrophe. Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels les parasites interfèrent avec la cellule-hôte restent à déterminer.

A - *Toxoplasma gondii* et la toxoplasmose

I. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii est un parasite protozoaire intracellulaire obligatoire décrit pour la première fois en 1908 par Nicolle et Manceaux dans les tissus d'un rongeur, *Ctenodactylus gondii*.

T. gondii appartient au règne des *Protista* et au phylum des Apicomplexae qui est défini par la présence d'un complexe apical incluant des organelles sécrétoires.

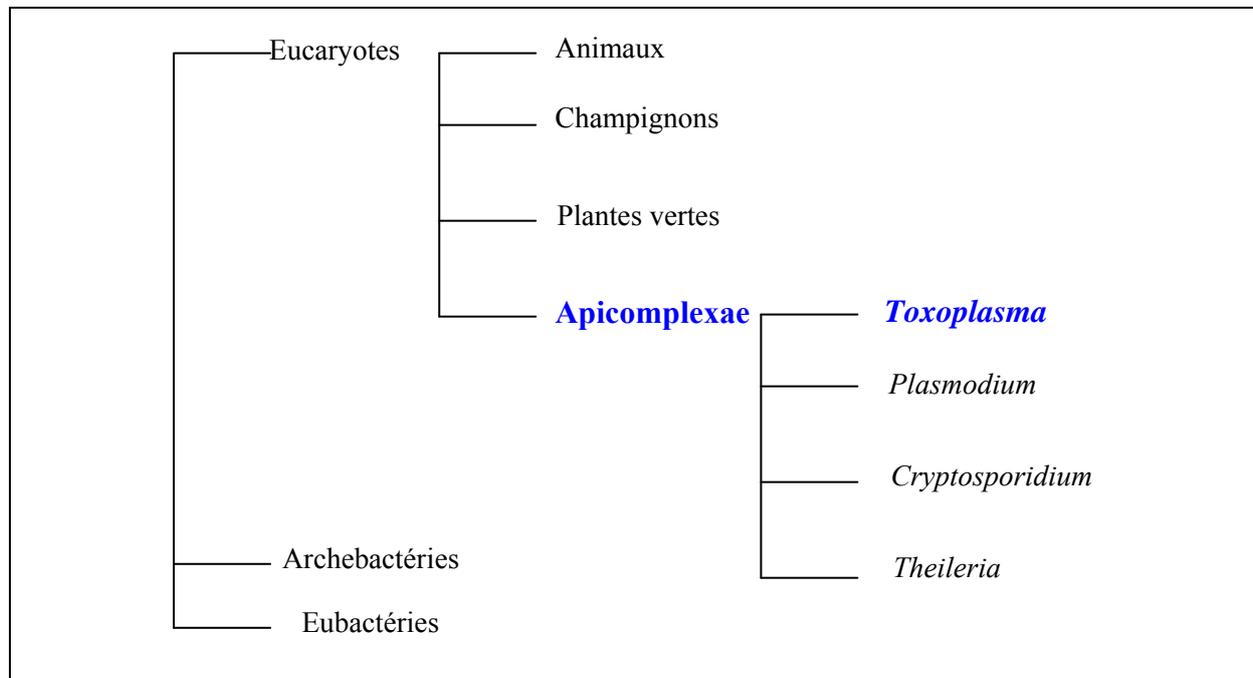


Figure 1 : *T. gondii* est un parasite eucaryote appartenant au phylum des Apicomplexae

I.1. Stades parasitaires

T. gondii est un parasite intracellulaire obligatoire et possède un cycle hétéroxène facultatif entre les félins (hôte définitif) et les animaux homéothermes (hôtes intermédiaires). Le cycle de développement comprend 3 stades évolutifs :

- le **sporozoïte**, issu de la reproduction sexuée du parasite, il est éliminé dans le milieu extérieur sous forme d’ocystes contenant les sporozoïtes dans les fèces de chat.

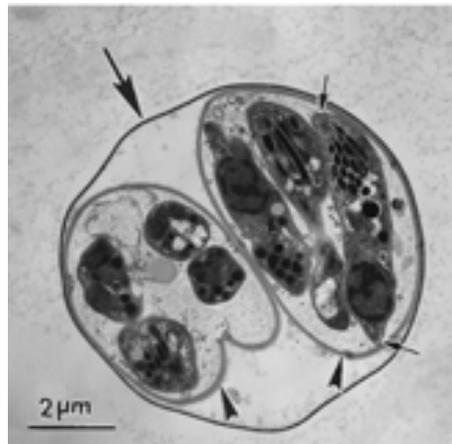


Figure 2 : Oocyste de *T. gondii*. Paroi mince (grande flèche), deux sporocystes (têtes de flèche) et les sporozoïtes, dont l'un est coupé longitudinalement (petites flèches) (Dubey *et al.*, 1998).

- le **tachyzoïte**, forme intracellulaire végétative, présent pendant la phase aiguë de l’infection, il infecte les cellules nucléées de l’hôte et s’y multiplie au sein d’une vacuole parasitophore. Il se présente sous forme de croissant de 5 à 10 µm de long sur 2 à 5 µm de large (Figure 3).

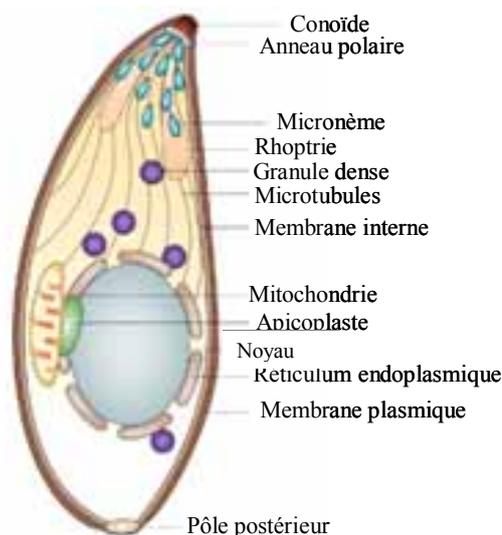


Figure 3 : Structure d’un tachyzoïte (d’après Baum *et al.*, 2006)

La partie antérieure présente une structure caractéristique du phylum des Apicomplexae : un complexe apical qui comporte un élément participant à la mobilité du parasite et à sa pénétration dans les cellules, le conoïde, et des organelles à activité sécrétoire (rhoptries, micronèmes et granules denses). L'apicoplaste, plastide dérivant d'un chloroplaste ancestral, a un rôle encore mal défini (Mc Fadden *et al.*, 1996).

Le tachyzoïte est capable de pénétrer dans tout type cellulaire. La pénétration est un phénomène actif, très rapide (moins de 20 secondes). Après pénétration, le parasite s'entoure d'une vacuole parasitophore limitée par une membrane. A l'intérieur de la vacuole parasitophore, le parasite se multiplie de façon asexuée par endodyogénies répétées (Figure 4) : deux cellules-filles sont assemblées dans une cellule-mère intacte et polarisée ; deux parasites sont généralement produits pour chaque cycle cellulaire mitotique, la réplication est synchrone, ce qui entraîne l'expansion clonale de la descendance jusqu'à ce que la cellule-hôte soit lysée (Hu *et al.*, 2002). Le taux de réplication est dépendant de la souche parasitaire et du type de cellule-hôte.

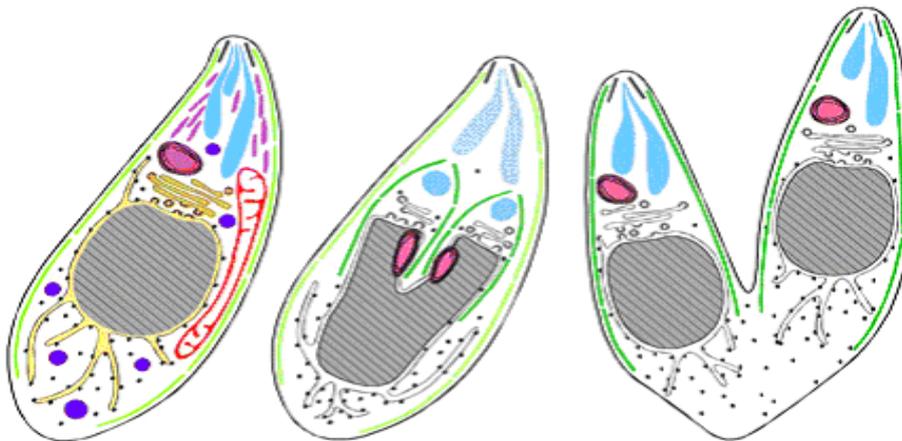


Figure 4 : Endodyogénie des tachyzoïtes de *T. gondii* (d'après Nishi *et al.*, 2008)

- le **bradyzoïte**, forme végétative intracellulaire, il caractérise la phase chronique de l'infection. Le stade bradyzoïte résulte de la transformation du stade précédent. Structuralement, les bradyzoïtes diffèrent peu des tachyzoïtes : noyau en position postérieure, présence de plus de grains d'amylopectine, apparence plus fine et enfin ils sont moins sensibles à la destruction par les enzymes protéolytiques (Figure 5). Cette transformation s'accompagne de la modification de la vacuole parasitophore dont la membrane s'épaissit. Ainsi se constitue le kyste toxoplasmique, structure sphérique

intracellulaire qui peut mesurer de 5 à 100 μm . Il peut contenir des centaines voire des milliers de bradyzoïtes (Figure 5).

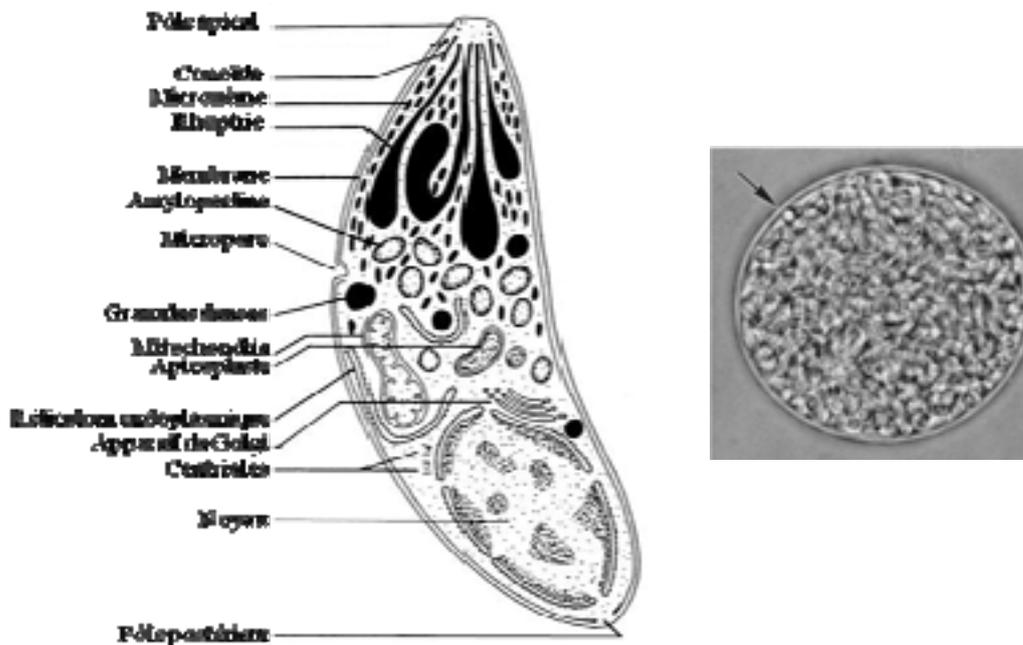


Figure 5 : Structure d'un bradyzoïte (gauche). Kyste tissulaire (cerveau de souris) renfermant des centaines de bradyzoïtes (droite) (Dubey *et al.* , 1998).

La transformation des tachyzoïtes en bradyzoïtes et de la vacuole parasitophore en kyste est un phénomène qui intervient très rapidement (dès 48 heures en culture cellulaire ; dès le 6ème jour après l'infection dans la toxoplasmose expérimentale de la souris). L'élément déclenchant majeur de cette transformation est une inhibition de l'activité mitochondriale des parasites sous l'influence de protéines de stress du toxoplasme induites par différents stimuli tels que l'IFN- γ , le NO ou le TNF (Tomavo, 2001).

Les kystes peuvent se former dans n'importe quel type cellulaire mais persisteront préférentiellement dans les neurones, les astrocytes, les cellules musculaires et les cellules rétinienne. Il est admis que les kystes peuvent persister pendant toute la vie de l'hôte. A la mort de la cellule-hôte, la paroi du kyste se rompt et les bradyzoïtes sont libérés dans le milieu extracellulaire. Si le système immunitaire est efficace, certains toxoplasmes seront détruits par le système immunitaire avant de pouvoir pénétrer dans de nouvelles cellules, d'autres pourront se réfugier dans des cellules voisines et donner de nouveaux kystes.

Le processus d'interconversion est au centre de la pathogenèse. De nombreux facteurs favorisent l'initiation de la conversion du stade tachyzoïte au stade bradyzoïte (Figure 6) tels que les variations de pH, les chocs thermiques ainsi que certains facteurs immunitaires dirigés contre le parasite : des facteurs de stress oxydatif (capables d'inhiber les fonctions mitochondriales du parasite) comme le NO (monoxyde d'azote) ou des facteurs cytokiniques comme l'IFN- γ , le TNF- α ou l'IL-12.

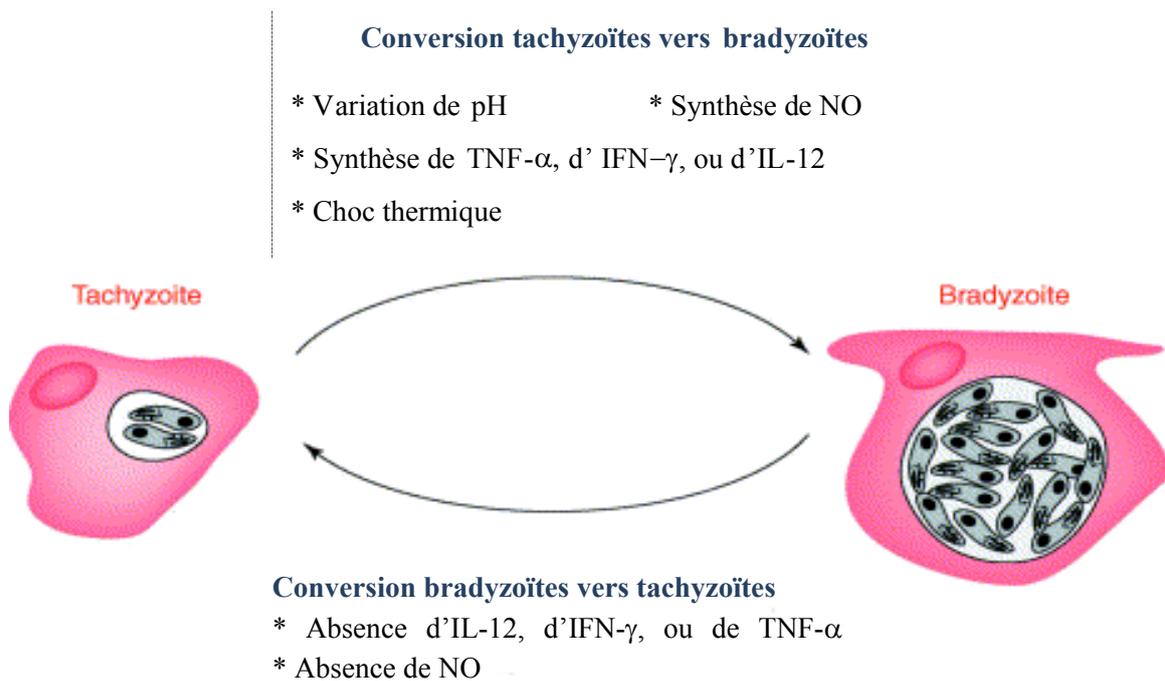


Figure 6 : Processus d'interconversion (Adaptée de Lyons *et al.*, 2002)

L'interconversion s'accompagne de l'activation ou de la répression de gènes spécifiques (Radke *et al.*, 2005) et pourrait impliquer un processus de régulation transcriptionnelle. Cependant des études récentes mettent en évidence la pénurie de facteurs de transcription chez les Apicomplexae malgré un cycle de vie complexe (Iyer *et al.*, 2008, Templeton *et al.*, 2004). La régulation transcriptionnelle intervenant lors de la différenciation parasitaire reposerait donc plus probablement, non pas sur des mécanismes faisant intervenir des facteurs de transcription, mais plutôt sur une régulation fine de la structure chromatinienne (Bougdour *et al.*, 2010, Hakimi et Deitsch, 2007, Sullivan et Hakimi, 2006). Deux grandes modifications peuvent moduler la chromatine : la méthylation de l'ADN et le remodelage des histones.

L'ADN de *T. gondii* contient des répétitions G-C mais aucune méthylation de l'ADN n'a été détectée (Gissot *et al.*, 2008) et on retrouve une organisation nucléosomale analogue à celle des eucaryotes. La modification des histones fait notamment intervenir des acétylations, des méthylations ou des phosphorylations, ceci entraînant une modulation du niveau de compactage de la chromatine. Le parasite possède de nombreuses enzymes capables de modifier les histones (Sautel *et al.*, 2009, Sautel *et al.*, 2007, Bhatti *et al.*, 2006) et plusieurs modifications de ces histones ont été rapportées telles que l'acétylation de l'histone H4 ou la méthylation de l'histone H3.

I.2. Organisation moléculaire

Trois organelles sécrétoires sont retrouvées dans le cytoplasme de *T. gondii* : les micronèmes, les rhoptries et les granules denses. Elles sont impliquées dans l'invasion et dans les interactions du parasite avec la cellule-hôte (Figure 7).

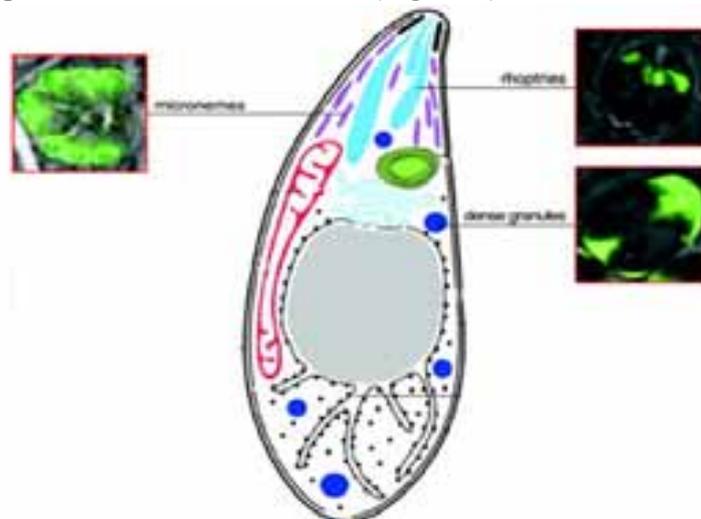


Figure 7 : Organelles de *T. gondii*. Les rhoptries et les micronèmes sont retrouvés au pôle apical du tachyzoïte. Les granules denses sont distribués dans toute la cellule (d'après Joiner and Roos, 2002).

Le contenu de ces 3 organelles sécrétoires est déchargé séquentiellement ; les protéines de micronèmes en premier au contact de la cellule-hôte, elles sont impliquées dans des fonctions de reconnaissance et d'attachement à la cellule-hôte. Le contenu des rhoptries est relargué dans un deuxième temps et il est impliqué dans la formation de la vacuole parasitophore entre autres. Les protéines de granules denses sont relarguées durant et après l'invasion dans la vacuole parasitophore.

I.2.1. Protéines de surface

Il en existe plus de 20 identifiées à ce jour appartenant à 5 superfamilles : SAG (Surface Antigen) 1 à 5. Elles participent à l'attachement et à la pénétration dans la cellule-hôte ainsi qu'à la modulation de la réponse immunitaire (Lekutis *et al.*, 2001).

I.2.2. Micronèmes

Environ une centaine de micronèmes remplissent le complexe apical de chaque parasite. Ces petits organites allongés sont généralement orientés selon l'axe principal du parasite dans la région apicale et à la périphérie du parasite (Dubey *et al.*, 1998). Ils jouent un rôle essentiel dans la survie et la propagation parasitaire. Les protéines de micronèmes sont impliquées dans la motilité, l'invasion et la virulence (Cérède *et al.*, 2005). Une vingtaine de protéines ont été identifiées à ce jour, la plupart d'entre-elles étant des adhésines transmembranaires ou des protéines accessoires de ces adhésines. Elles sont libérées lors du contact initial du parasite avec la cellule-hôte et participent à l'attachement du parasite à la membrane de la cellule-hôte (Carruthers, 2002). La sécrétion des micronèmes est stimulée par la mobilisation du calcium intracellulaire parasitaire (Carruthers et Sibley 1999). Dans certains cas, ces protéines ont été retrouvées fixées à des récepteurs de la cellule-hôte (Garcia-Réguet *et al.*, 2000 ; Brecht *et al.*, 2001). Les micronèmes seraient impliqués dans la création de l'interface de liaison entre le parasite et la membrane plasmique. La réduction d'expression d'AMA1 (Apical Membrane antigen 1), une protéine de micronème, empêche la formation de la jonction mobile ainsi que l'invasion. Les parasites sont capables d'adhérer à la cellule-hôte mais ils échouent à former une association intime (Mital *et al.*, 2005). De plus, AMA1 est associée à des protéines de rhoptries au niveau de la jonction mobile. Cette coopération contribue à créer une interface entre la parasite et la membrane plasmique et pourrait également participer à l'exclusion de certains marqueurs-hôtes de l'intérieur de la vacuole parasitophore en formation, permettant ainsi la survie du parasite (Alexander *et al.*, 2005).

I.2.3. Rhoptries

Les rhoptries sont des organelles sécrétoires uniques et essentielles pour le parasitisme des Apicomplexae. L'intégrité de ces organelles affecte la capacité des parasites à envahir la

cellule-hôte et à y établir une niche permissive pour sa réplication (Nakaar *et al.*, 2003).

Les tachyzoïtes contiennent typiquement 12 rhoptries, chacune faisant 2 à 3 micromètres de long (Dubey *et al.*, 1998). Les rhoptries sont très conservées dans le phylum des Apicomplexae, c'est pourquoi on les suspecte d'avoir un rôle-clé dans le cycle intracellulaire de ces pathogènes. Elles sont souvent regroupées en grappes allongées au pôle antérieur du parasite et fréquemment sur un seul côté. L'intérieur des rhoptries semble organisé en discrets sous-compartiments mais aucune membrane interne ne semble séparer ces domaines.

Il y a 29 protéines de rhoptries connues, dont 24 sont présentes dans le bulbe (appelées ROP) et 5 dans le cou des rhoptries (appelées RON). La plupart des ROP et des RON sont spécifiques des Apicomplexae et comportent peu d'homologies avec des protéines d'eucaryotes supérieurs. Cependant, certaines ROP portent des signatures enzymatiques, essentiellement kinases, phosphatases et protéases (Boothroyd et Dubremetz, 2008). Plusieurs RON possèdent des orthologues évidents dans des genres apparentés comme *Plasmodium* ce qui suggère leur implication dans des processus communs au phylum des Apicomplexae. Enfin, les rhoptries contiennent également des lipides et un fort taux de cholestérol (Foussard *et al.*, 1991).

La seule circonstance dans laquelle les rhoptries sont connues pour sécréter leur contenu est durant le processus d'invasion de la cellule-hôte. Le signal de sécrétion n'est pas connu, mais il dépend évidemment de la reconnaissance directe entre la surface apicale du parasite et des molécules réceptrices de la cellule-hôte. Quel que soit le processus, une ouverture distincte a été observée au pôle antérieur du tachyzoïte durant l'invasion cellulaire (Nichols *et al.*, 1983). Ceci pourrait être l'ouverture à travers laquelle le contenu des rhoptries est déversé. Une fois relarguées, les protéines de rhoptries ont des destinations diverses :

- les protéines RON2, 4 et 5 forment un complexe avec la protéine de micronème AMA1 et ce complexe se localise au niveau de la jonction mobile (Lebrun *et al.*, 2005, Alexander *et al.*, 2005).

- les ROP semblent avoir une tout autre fonction que celle des RON. Comme les RON, les ROP sont relarguées durant l'invasion mais ne forment pas de structures organisées et ne sont pas retrouvées dans la jonction mobile. Elles migrent vers 3 localisations principales : la lumière de la vacuole parasitophore naissante, la membrane de la vacuole parasitophore ou l'intérieur de la cellule-hôte. ROP1 par exemple s'accumule dans la lumière de la vacuole parasitophore en formation mais on la retrouve également dans de petites vésicules dépourvues de parasite et appelées évacuoles (empty vacuoles) (Ossorio *et al.*, 1992, Hakanson *et al.*, 2001). Les protéines ROP2 migrent en général vers la deuxième localisation,

la membrane de la vacuole parasitophore (Carey *et al.*, 2004 ; Beckers *et al.*, 1994). La protéine ROP2 y est insérée et son domaine N-terminal est exposé dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Elle est impliquée dans le recrutement des mitochondries de la cellule-hôte (Sinai *et al.*, 1997, Sinai *et al.*, 2002). La troisième destination connue pour les ROP est l'intérieur de la cellule-hôte et plus spécifiquement le noyau. Deux protéines de rhoptries ont été observées dans le noyau, une protéine phosphatase de la classe 2C (PP2C) (Gilbert *et al.*, 2007) et ROP16 (Saeij *et al.*, 2007). Ce processus intervient très rapidement après l'invasion puisque ces deux protéines sont retrouvées dans le noyau 15 minutes après l'infection. Ces deux protéines migrent vers le noyau de la cellule-hôte en utilisant un signal de localisation nucléaire qu'elles portent.

I.2.4. Granules denses

Ce sont des vésicules sécrétrices de 200 nm de diamètre et entourées d'une membrane unique. Leur nombre varie de 3 à 15 par parasite. Ils jouent un rôle majeur dans les modifications structurales de la vacuole parasitophore (Mercier *et al.*, 2005). Les protéines des granules denses sont libérées à l'intérieur de la vacuole pendant et après la pénétration dans la cellule-hôte. Il existe 12 protéines de granules denses (GRA1-10,12) plus 2 NTPase I et II (nucleotide triphosphate hydrolase) et 2 inhibiteurs de protéases (TgPI 1 et 2) (Cesbron-Delauw 1994, Ahn *et al.*, 2005, Rome *et al.*, 2008, Michelin *et al.*, 2009). Elles s'associent à la vacuole parasitophore et au réseau tubulaire de la cellule-hôte, intervenant de ce fait dans le recrutement des nutriments et dans l'inhibition des voies apoptotiques de la cellule-hôte (Carruthers, 2002 ; Mercier *et al.*, 2005 ; Coppens *et al.*, 2006). GRA7 est impliqué dans la séquestration des vésicules endolysosomales à l'intérieur de la vacuole parasitophore (Coppens *et al.*, 2006). Beaucoup de protéines GRA possèdent des domaines transmembranaires putatifs. Parmi celles-ci, GRA3 et GRA5 seraient impliquées dans l'ancrage de la membrane de la vacuole parasitophore (MVP) au réticulum endoplasmique (Kim *et al.*, 2008). Les délétions ciblant GRA2 et 6 affectent la virulence des souches et induit le développement d'une infection chronique chez les souris (Mercier *et al.*, 1998).

I.3. Génotype et virulence

Les souches de *T. gondii* diffèrent énormément en matière de virulence bien qu'elles soient génétiquement assez similaires. En effet, malgré 98% d'identité génétique, de grandes différences en matière de virulence existent (Sibley et Boothroyd, 1992). Bien qu'une seule espèce, *T. gondii*, soit décrite au sein du genre *Toxoplasma*, plus de 200 isolats ou souches ont bénéficié à ce jour d'analyses génotypiques. La pathogénicité des souches est définie par l'étude de la virulence chez la souris : détermination des DL50 et DL100, doses minimales de parasites entraînant la mort de 50% ou de 100% des souris infectées. La plupart des isolats analysés (95%) sont généralement regroupés en 3 génotypes principaux (types I, II et III) en fonction de leur virulence (Ajzenberg *et al.*, 2002 ; Darde *et al.*, 1992 ; Howe et Sibley, 1995). Cependant, il existe quelques souches atypiques caractérisées par la présence d'allèles uniques non retrouvés dans les 3 types principaux.

Tableau 1 : Caractéristiques des différentes souches de *T. gondii*

	Type I	Type II	Type III
Répartition chez l'homme	De 0 à 40% des souches isolées	De 40 à 100% des souches isolées	< 20% des souches isolées
Multiplication	Rapide en tachyzoïtes Peu de conversion en bradyzoïtes et de formation de kystes <i>in vivo</i>	Lente ; Conversion en bradyzoïtes et formation de kystes <i>in vivo</i>	Multiplication intermédiaire ; formation de kystes <i>in vivo</i>
Virulence	Très virulent chez la souris (toxoplasmose aiguë, létale) DL100 : 1 ou 2 parasites	Non virulent chez la souris DL50 > 10 ³	Virulence intermédiaire entre types I et II ; Souvent létal chez la souris DL50 > 10 ³

En France, il existe une prédominance très nette des souches de type II (85%) alors que les souches de type I ne représentent que 8% et celles de type III, 2% des souches (Honore *et al.*, 2000). La situation peut être très différente dans d'autres pays ; en Espagne, tout comme en Angleterre, les souches de type I ont une fréquence plus élevée (Aspinall *et al.*, 2003 ; Fuentes *et al.*, 2001).

La souche RH, utilisée au cours de ma thèse, a été isolée par Sabin en 1941, à partir d'un cas d'encéphalite humaine aiguë.

Bien que des différences soient observées dans les pathologies induites par les différentes souches chez la souris, il n'y a pas de garantie que ces différences soient observées chez d'autres hôtes. Plusieurs études ont montré que les souches de type II étaient plus fréquemment retrouvées chez les patients VIH et lors d'infections congénitales (Howe *et al.*, 1997, Howe *et al.*, 1995, Ajzenberg *et al.*, 2009). Ceci pourrait refléter soit une tendance de cette souche à entraîner des pathologies chez l'homme, soit une représentation disproportionnée de cette souche dans les réservoirs animaux. Différentes études montrent d'ailleurs un biais en faveur des souches de type II dans la population animale (Ajzenberg *et al.*, 2002, Howe *et al.*, 1997, Owen *et al.*, 1999). D'autres études montrent que dans les cas rares de pathologies oculaires graves chez les patients immunocompétents, les souches de type I ou les souches atypiques sont les plus fréquemment retrouvées (Grigg *et al.*, 2001). Pour identifier les gènes responsables de la virulence, des expériences ont été effectuées en croisant des souches de type I et III ou II et III introduites ensuite chez la souris. Cinq VIR (Virulent loci) ont été mis en évidence. Parmi ceux-ci, ROP18 est un gène-candidat à la virulence. ROP18 appartient à la famille des protéines de rhoptries ROP2 qui sont des sérine-thréonine kinases et possède une fonction kinase active. On la retrouve dans la vacuole parasitophore après l'invasion de la cellule-hôte. Le niveau d'expression de ROP18 varie en fonction de la souche. Ainsi, dans les souches de type III, elle est presque indétectable comparé aux souches de type I (Taylor *et al.*, 2006). Le grand polymorphisme et les différences importantes observées dans l'expression de ROP18 expliquent les différences de virulence des souches. La transfection de l'allèle *ROP18* de type I dans une souche non pathogénique de type III entraîne une augmentation de la croissance du parasite et de la mortalité chez les souris (Taylor *et al.*, 2006).

I.4. Invasion de la cellule-hôte

L'invasion de la cellule-hôte par *T. gondii* est un processus complexe (Figure 9). Premièrement, le parasite s'attache faiblement à la surface de la cellule-hôte, processus médié par des protéines de surface du parasite dont la plupart sont des GPI-linked protéines appelées SAG (Surface antigens), SRS (SAG-related sequences) et SUSA (SAG-unrelated antigens) (Pollard *et al.*, 2008).

Suite à cet attachement, un signal déclenche une augmentation de calcium cytosolique qui

stimule la sécrétion des micronèmes. L'attachement des adhésines micronémales aux cellules-hôtes induit une liaison forte entre le parasite et la cellule-hôte (Carruthers et Boothroyd, 2007). Bien que les effecteurs conduisant à la libération du contenu des micronèmes ne soit pas connus, des kinases calcium dépendantes (CDPK) seraient impliquées. Une CDPK toxoplasmique (TgCDPK1) pouvant réguler la mobilité et l'invasion a été décrite (Kieschnick *et al.*, 2001). Il existerait dans le génome de *T. gondii* d'autres CDPK capables de réguler la sécrétion des micronèmes et l'invasion parasitaire (Nagamune et Sibley, 2006).

Le parasite utilise alors une forme unique de mobilité appelée « gliding motility » dont le moteur est l'actine du cytosquelette du parasite (Dobrowolski et Sibley 1996). Un second signal inconnu déclenche alors l'exocytose des protéines contenues dans les rhoptries. Après leur sécrétion, quatre protéines (RON2, 4, 5 et 8) se lient à AMA1, une protéine de micronème (Alexander *et al.*, 2005, Straub *et al.*, 2009). Ensemble, ces protéines forment la jonction mobile (JM) qui est à l'interface du parasite et de la membrane de la cellule-hôte et l'on pense qu'elle constitue un attachement stable à partir duquel l'invasion active de la cellule peut se dérouler. La JM pourrait également fonctionner comme un tamis moléculaire qui filtrerait sélectivement les protéines transmembranaires de l'hôte pouvant intégrer la membrane de la vacuole naissante (Charron et Sibley 2004). Cette sélection des protéines-hôtes est un élément critique pour la survie du parasite puisqu'on pense qu'elle participe au fait que la vacuole parasitophore est de nature non-fusogénique et quelle est dépourvue de marqueurs d'endocytose qui feraient de la vacuole parasitophore une cible pour la destruction lysosomale. Le modèle proposé est que RON2, par son domaine transmembranaire, fixe la JM à la membrane de la cellule-hôte, alors qu'AMA1 assure l'ancrage de la JM au parasite. Les partenaires solubles de la JM (RON8, 5 et 4) seraient attachés par RON2 à la face interne de la membrane de la cellule-hôte et seraient impliqués dans la consolidation de la liaison ou bien dans le tamisage moléculaire (Figure 8) (Straub *et al.*, 2009). RON8, au sein de la JM, est localisée du côté de la face cytoplasmique de la membrane de la cellule-hôte. Elle pourrait de ce fait interagir avec des composants intracellulaires comme le cytosquelette par exemple.

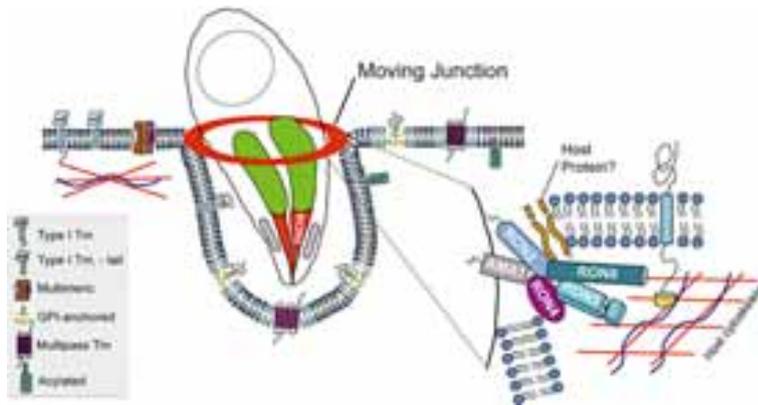


Figure 8. Modélisation de la jonction mobile. AMA1 et RON2 serviraient de points d'ancrage pour la jonction entre le parasite et la membrane de la cellule-hôte respectivement. RON4, RON5, RON8 sont attachés à la face cytoplasmique de la membrane plasmique par RON2 où ils sont positionnés pour effectuer d'autres points d'ancrage au cytosquelette de l'hôte (Straub *et al.*, 2009).

La toxofiline, une actin-binding protein (ABP) retrouvée dans les rhoptries, interagit également avec le cytosquelette d'actine de la cellule-hôte (Poupel *et al.*, 2000). Au fur et à mesure que l'invasion progresse, la jonction mobile migre vers l'extrémité postérieure du parasite formant les contours de la vacuole parasitophore naissante et excluant de cette membrane plusieurs protéines hôte et parasitaires.

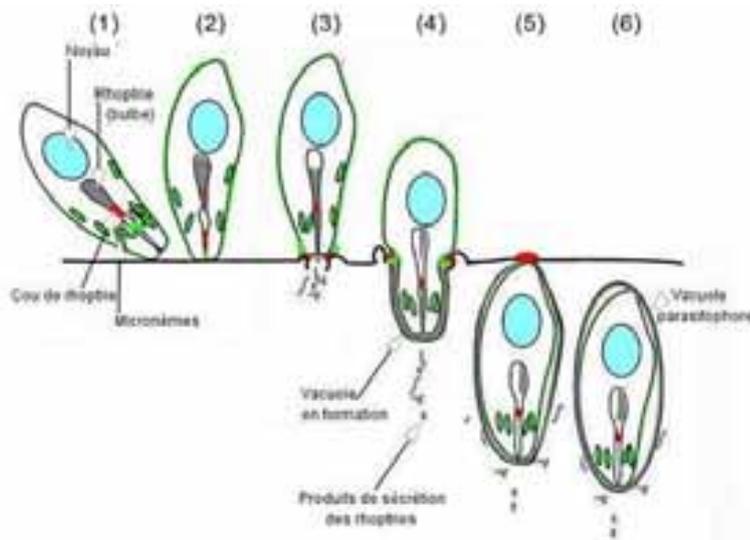


Figure 9 : Invasion de la cellule-hôte par *T. gondii* (d'après Alexander *et al.*, 2005). (1) Lors du contact avec la membrane de la cellule-hôte, les protéines des micronèmes (en vert) et du cou des rhoptries (en rouge) sont sécrétées en surface du parasite, permettant (2) l'association serrée et la réorientation du parasite. (3) Le contenu du bulbe des rhoptries (en gris) est alors sécrété à son tour : des vésicules sont libérées dans le cytoplasme de la cellule-hôte, prélude à la formation de la vacuole. (4) Le parasite se propulse dans la cellule-hôte, formant la vacuole parasitophore par invagination de la membrane plasmique. (5) Lorsque le parasite est complètement rentré dans la vacuole, (6) celle-ci se referme en relâchant le complexe de jonction mobile.

La formation de la vacuole parasitophore est un phénomène qui se déroule en deux temps. Dans un premier temps, elle se forme lors de la pénétration du parasite puis, dans un deuxième temps elle sera modifiée par l'intégration des évacuoles. En effet, l'invasion de la cellule-hôte est couplée à la décharge rapide des rhoptries. Le contenu des rhoptries est relargué dans des vésicules dans le cytoplasme (évacuoles) de la cellule-hôte et dans la vacuole parasitophore. Les évacuoles ont une morphologie multi-lamellaire probablement riche en lipides provenant des rhoptries elles-mêmes. Elles migrent dans le cytoplasme de la cellule-hôte par un processus dépendant des microtubules de la cellule. Elles vont fusionner avec la vacuole parasitophore ce qui permet non seulement de modifier la structure de cette vacuole en y incluant des protéines de rhoptrie, mais également de lui donner sa capacité unique à recruter les organelles de la cellule-hôte et à éviter l'endocytose. Ce modèle dans lequel la vacuole parasitophore se formerait en deux étapes permet d'expliquer l'extension considérable de la membrane de la vacuole parasitophore durant les 30 à 60 minutes qui suivent sa formation (Hakansson *et al.*, 2001).

La sortie du parasite de la cellule-hôte : elle nécessite la rupture de plusieurs barrières comme la membrane de la vacuole parasitophore, les organelles, le cytosquelette et la membrane plasmique de la cellule-hôte (Figure 10). Idéalement, le parasite synchronise la rupture de ces barrières avec la fin de son cycle réplcatif pour être tout à fait prêt à infecter une cellule voisine. C'est un phénomène actif. Les auteurs ont établi un rôle du flux d'ions K^+ et Ca^{+2} dans la motilité des parasites et leur sortie (Lavine et Arrizabalaga, 2007).

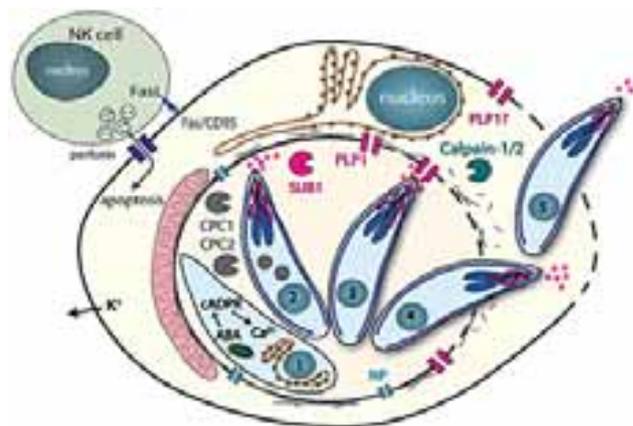


Figure 10 : Sortie du parasite. (1) Transmission d'un signal d'égression. (2) Sécrétion des protéines de micronèmes et activation du système de motilité (lignes bleues sous la membrane du tachyzoïte). (3) Perturbations de la vacuole parasitophore. (4) Perturbations du cytosquelette de la cellule-hôte et de la membrane plasmique. (5) Sortie active de la cellule-hôte (Roiko *et al.*, 2009).

La deuxième étape est représentée par la formation de pores dans la membrane de la vacuole parasitophore. *T. gondii* sécrète une « pore forming protein », TgPLP1, cruciale pour l'égression rapide du parasite. Les pores formés par TgPLP1 permettent également l'égression de protéases (Cathepsin C-like protéases, Subtilisine TgSUB1, métalloprotéases) et de lipases de la vacuole parasitophore vers le cytosol qui pourront perturber l'organisation structurale du cytosquelette et de la membrane plasmique de la cellule-hôte (Roiko *et al.*, 2009). Une protéase calcium-dépendante de l'hôte, la calpaïne-1, est également requise pour l'égression du parasite (désorganisation du cytosquelette).

I.5. Cycle parasitaire

Le cycle évolutif comprend une phase de multiplication sexuée qui a lieu chez le chat et une phase de multiplication asexuée qui a lieu chez les vertébrés à sang chaud (Figure 11).

Le cycle sexué a lieu chez l'hôte définitif (principalement le chat) qui se contamine par ingestion de kystes contenus dans leur proie ou par l'intermédiaire d'oocystes matures souillant l'eau et les végétaux. Dans les cellules épithéliales intestinales de l'hôte, les formes asexuées se transforment en gamétocytes mâles et femelles. La fécondation conduit à la formation d'oocystes non sporulés, non infectieux excrétés dans les fèces des félinés. Dans le milieu extérieur, ces oocystes deviennent infectieux en 1 à 5 jours après sporogonie qui permet la formation des sporozoïtes. Les oocystes émis sont hautement infectieux et extrêmement stables dans l'environnement.

Le cycle asexué peut se dérouler théoriquement dans tous les animaux à sang chaud allant du poulet, aux otaries et à l'Homme. Après ingestion des oocystes, leur paroi se rompt dans l'intestin ; les sporozoïtes libérés pénètrent dans les cellules épithéliales intestinales, se transforment en tachyzoïtes qui se disséminent rapidement dans l'organisme. Les parasites s'enkystent dans les tissus, sources de contamination de l'hôte définitif. Après une phase de multiplication active du parasite sous forme de tachyzoïtes, ces hôtes hébergeront à leur tour des kystes toxoplasmiques quiescents (Rapport AFSSA, 2005).

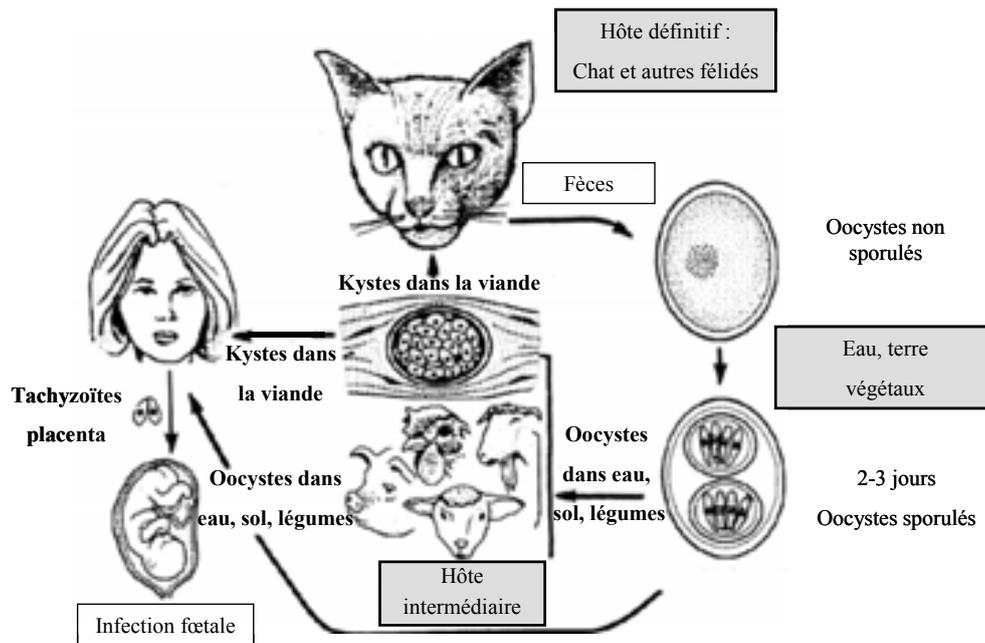


Figure 11 : Cycle parasitaire de *T. gondii* (d'après Dubey *et al.*, 1998)

La contamination des hôtes intermédiaires, dont l'homme, peut se faire :

- à partir des oocystes disséminés dans l'environnement : consommation de végétaux souillés par les oocystes, contamination possible d'origine hydrique ou tellurique. L'apparition de toxoplasmoses aiguës dues à des expositions à des sources d'eau contaminées ces dernières années font de *T. gondii* un agent pathogène transmis par l'eau à ne pas négliger. C'est le cas au Canada, où une étude de 1995 montrait que 100 personnes avaient été contaminées par *T. gondii* par l'eau souillée par des félinés infectés (Bowie *et al.*, 1997).
- à partir des kystes tissulaires présents chez les hôtes intermédiaires : consommation de viande infectée d'animaux de rente ou de gibier (mammifères et oiseaux).
- possibilité d'une transmission congénitale par passage transplacentaire des tachyzoïtes lors d'une phase de parasitémie maternelle.
- transmission plus exceptionnelle par greffon lors de transplantation ou par inoculation accidentelle.

II. La toxoplasmose

II.1. Epidémiologie

La toxoplasmose est une anthroponose cosmopolite constituant un problème de santé humaine et vétérinaire.

La prévalence de la toxoplasmose dans la population humaine varie d'un pays à l'autre, en fonction des habitudes alimentaires ou des conditions d'hygiène par exemple. En France, la séroprévalence de la toxoplasmose chez l'adulte est élevée et atteint 50 à 70% (Rapport AFSSA, 2005) (Figure 12).

Le risque épidémique pour la toxoplasmose semble faible mais il n'est pas nul ; le risque endémique est par contre élevé si l'on se réfère à la séroprévalence de la toxoplasmose dans la population française.



Figure 12 : Prévalence de la toxoplasmose en France (Rapport AFSSA, 2005).

L'une des explications des différences de prévalence observées en France et dans plusieurs pays d'Europe de l'Ouest et du Sud comparativement à d'autres pays voisins et de niveaux d'hygiène comparables, comme l'Angleterre (prévalence 10-15%) serait, dans les pays à forte prévalence, l'habitude de consommer certaines viandes peu cuites. Cependant, on ne peut exclure d'autres facteurs épidémiologiques encore mal connus intervenant dans la circulation des parasites.

II. 2. Manifestations physiopathologiques

Habituellement bénigne chez l'être humain, elle est asymptomatique dans 90% des cas d'infection aiguë (Montoya et Liesenfeld., 2004). Trois situations cliniques sont à distinguer : la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent, la toxoplasmose de l'immunodéprimé, la toxoplasmose congénitale.

II.2.1. La toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent

Généralement asymptomatique ou bénigne, elle peut parfois se traduire par un syndrome pseudo-grippal accompagné ou non d'adénopathies (Montoya and Liesenfeld, 2004). Lors de la phase aiguë, la dissémination parasitaire est restreinte par la réponse immunitaire de l'hôte. La primo-infection évolue ensuite spontanément vers une phase chronique asymptomatique. Cela conduit à l'enkystement des parasites dans certains organes comme le cerveau ou les muscles, où la pression immunitaire est plus faible. Les kystes persistent toute la vie en l'absence de déficit immunitaire.

Cependant, compte tenu du neurotropisme de ce parasite, de sa séroprévalence relativement élevée et de sa capacité à induire des comportements autodestructeurs chez les rongeurs, des auteurs ont émis l'hypothèse d'un effet du parasite sur les performances cognitives de l'homme. Chez les rongeurs, des études montrent que le parasite induit une diminution de la mémoire et de l'apprentissage, des phobies et altère les mécanismes naturels de défenses vis-à-vis des prédateurs (Webster, 2007, Berdoy *et al.*, 2000). Chez l'homme, l'infection pourrait être un facteur favorisant le développement de troubles du comportement comme la schizophrénie (Mortensen *et al.*, 2007, Yolken *et al.*, 2009). L'infection pourrait également entraîner des troubles de la personnalité et une augmentation des risques d'accidents de voiture dus à un temps de réaction retardé (Holliman, 1997, Flegr, 2007, Torrey et Yolken 2003). Miman *et al.*, (1997) ont étudié la possible implication de l'infection par *T. gondii* dans la maladie de Parkinson, pathologie neuro-dégénérative. Ils ont rapporté un fort pourcentage de patients présentant des anticorps IgG anti-*Toxoplasma gondii* chez les patients atteints de Parkinson par rapport au groupe contrôle non atteint (42,3% contre 22,5 %). Une étude récente relie même le titre d'anticorps anti-*Toxoplasma gondii* et la tentative de suicide chez des patients avec des troubles de l'humeur récurrents (Arling *et al.*., 2009, Kar et Misra, 2004). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que lors d'une infection par *T. gondii*, la réponse immunitaire de l'hôte induit une activation de l'IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase) pour

dégrader le tryptophane, acide aminé nécessaire à la croissance du parasite. L'activation de l'IDO est également connue pour causer des troubles de l'humeur, cognitifs et comportementaux (Dantzer *et al.*, 2008).

Lorsqu'elle est sévère, la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent peut prendre la forme :

- d'une toxoplasmose ganglionnaire : c'est la forme clinique la plus fréquente (15 à 20% des cas), elle est caractérisée par la présence d'adénopathies.
- d'atteintes oculaires : qui peuvent être contemporaines ou retardées de plusieurs années par rapport à la date d'infection (réactivation locale de kystes résiduels).
- d'atteintes multiviscérales.

II.2.2. La toxoplasmose de l'immunodéprimé

Elle touche les sujets présentant une immunodépression (VIH, allogreffe de moelle osseuse, greffe d'organe, chimiothérapie ou traitements immunosuppresseurs). Elle résulte d'une primo-infection ou d'une réactivation de kystes présents chez un sujet antérieurement infecté. Cette réactivation correspond à une conversion de la forme quiescente, kystes, à la forme proliférative où le parasite se multiplie et dissémine dans tout l'organisme. Dans le cas de transplantations d'organes, la réactivation peut se faire à partir du greffon si celui-ci est infecté (facilité par le traitement immunosuppresseur mis en place pour éviter les rejets).

L'atteinte cérébrale est de loin la plus fréquente (encéphalite toxoplasmique) et représente la deuxième infection opportuniste après la pneumocystose pulmonaire. Chez les patients immunodéprimés, la localisation oculaire est la deuxième, par sa fréquence, après la toxoplasmose cérébrale, à laquelle elle est associée dans 10 à 20% des cas. On peut observer des chorioretinites souvent associées à une uvéite antérieure. La localisation pulmonaire est peu fréquente mais d'une extrême gravité.

II.2.3. La toxoplasmose congénitale

Elle résulte d'une primo-infection toxoplasmique acquise par la mère au cours de la grossesse. Chez la mère, l'infection aiguë pourra être contrôlée par le système immunitaire. Par contre, chez le fœtus, le système immunitaire immature l'empêche de réagir contre le parasite. Elle a lieu par passage transplacentaire. Il n'y a pas de transmission chez la femme immunisée par une infection antérieure à la grossesse car la réponse immunitaire présente est protectrice et contrôle la dissémination parasitaire. La probabilité de transmission du parasite au fœtus et la gravité de l'atteinte fœtale évoluent inversement au cours de la grossesse (Montoya and Liesenfeld., 2004). La Figure 13 illustre le risque de transmission materno-fœtale et la gravité de l'atteinte de l'enfant en fonction de la période de primo-infection de la mère.

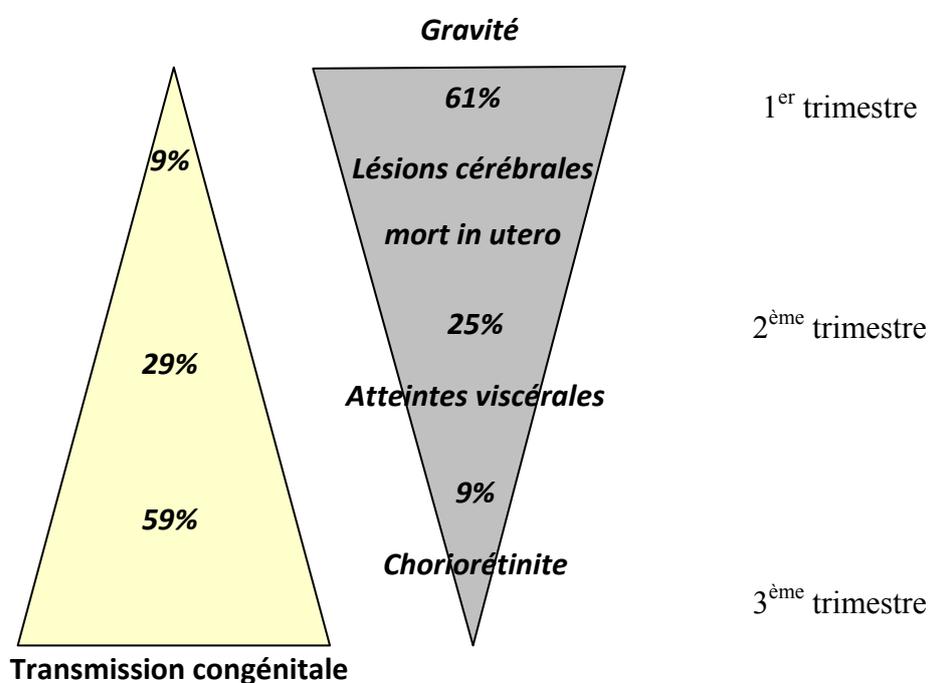


Figure 13 : Risque de transmission materno-fœtale et gravité de l'atteinte de l'enfant en fonction de la période de primo-infection de la mère

En début de grossesse, le risque de transmission est inférieur à 10 % mais l'atteinte fœtale est sévère, se traduisant par la mort *in utero* du fœtus ou par des lésions cérébrales graves avec décès à la naissance ou retard psychomoteur majeur. Au deuxième trimestre, le risque cumulé de toxoplasmose congénitale sévère est maximum, avec une prédominance de formes viscérales aiguës d'évolution souvent fatale à la naissance. Au troisième trimestre, le risque de

transmission dépasse 60% et atteint 80% en fin de grossesse. A ce stade, un retard de développement reste possible mais les lésions sont le plus souvent infracliniques. Une chorioretinite dont la conséquence majeure est la cécité, peut apparaître tardivement à la puberté. La chorioretinite toxoplasmique se traduit par une inflammation et une désorganisation de la structure de la rétine et de la choroïde, responsables de la perte de la vision (Nussenblatt *et al.*, 1994).

Les formes congénitales touchent chaque année environ 0,1% des nouveau-nés contaminés en cours de grossesse. Si les mesures de prévention de la toxoplasmose congénitale sont efficaces, elles n'empêchent pas la contamination de 4000 femmes enceintes et les 600 cas de toxoplasmoses congénitales par an en France.

Depuis 1992, la France a rendu obligatoire le suivi sérologique mensuel des femmes enceintes non immunisées contre la toxoplasmose. Cette disposition permet la détection des séroconversions maternelles. De plus, les enfants contaminés bénéficient d'un traitement et d'un suivi permettant le dépistage des séquelles tardives de la maladie.

II.2.4. La toxoplasmose oculaire

C'est une infection redoutable car potentiellement cécitante. Les lésions sont dues à la présence dans le tissu rétinien du parasite ainsi qu'à la réponse immunitaire de l'hôte. La chorioretinite toxoplasmique est le plus souvent le résultat d'une réactivation kystique locale, au niveau de la rétine, que ces kystes proviennent d'une toxoplasmose congénitale (cas le plus fréquent) ou d'une toxoplasmose acquise. On retrouve des zones de nécrose entourées d'une réaction inflammatoire intense. Elle peut aussi se manifester par une uvéite antérieure ou panuvéite (Figure 14).



Figure 14 : Chorioretinite consécutive à une toxoplasmose congénitale (Collection F. Peyron, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Lyon)

II.2.5. Problèmes vétérinaires

On peut ajouter que sur le plan de l'industrie agricole, la prévalence est également élevée de manière générale (supérieure à 50% en France pour le bétail). Le taux élevé d'avortements spontanés liés à la toxoplasmose dans les élevages ovins et caprins a des conséquences économiques importantes (Buxton, 1998).

T. gondii est une cause majeure de mortalité chez les otaries en Californie et contribue au faible renouvellement des populations. L'infection et les dommages cérébraux qu'elle occasionne sont directement corrélés à une augmentation de la mortalité due aux attaques de requins. En effet, elles seraient moins capables d'éviter les attaques, plus enclines à nager hors des zones protégées ou à attirer les requins par des mouvements anormaux. La contamination se ferait par l'ingestion d'oocystes résistants portés par les fèces des félins et transportés dans l'écosystème marin où ils peuvent être filtrés par les coquillages comme les moules, les huîtres ou les palourdes (qui servent de nourriture aux otaries). Dans 40% des cas, la souche isolée est une souche de type II et dans 60% des cas il s'agit d'une souche nommée souche de type X (Conrad *et al.*, 2005).

II.3. Traitements et prophylaxie

Il existe un nombre limité de médicaments regroupés en deux grandes familles : les inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique et les macrolides (Derouin, 2001). Ces médicaments ne sont actifs que sur les tachyzoïtes et non sur les kystes. Des résistances à certaines drogues ont été décrites pour certaines molécules (Baatz *et al.*, 2006, Aspinall *et al.*, 2002).

Un traitement n'est justifié que dans la toxoplasmose congénitale et dans les formes graves de toxoplasmose survenant chez les malades immunodéprimés ou consécutives à une infection par une souche très virulente. Ces traitements sont basés sur l'action de certains antibiotiques tels que la spiramycine, macrolide dont l'activité sur le ribosome est avant tout parasitostatique; la pyriméthamine, inhibiteur de la synthèse de l'acide folique agissant sur la dihydrofolate réductase parasitaire (biosynthèse des nucléoprotéines) ou encore la sulfadiazine inhibant la déhydroptéroate synthétase, enzyme essentielle dans la synthèse des folates. Parmi les différentes associations d'antibiotiques, seules les associations entre pyriméthamine et sulfadiazine ont fait la preuve d'une grande efficacité sur *T. gondii*. Cette

efficacité est liée au fait que ces 2 médicaments agissent en cascade sur la voie de synthèse des folates, produisant un effet synergique et permettant ainsi de potentialiser l'effet anti-parasitaire.

Il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin pour l'homme. Un vaccin basé sur l'infection par une forme atténuée du parasite, incapable de former des formes kystiques, est utilisé pour lutter contre la toxoplasmose congénitale chez le mouton (Buxton et Innes, 1995). Mais l'utilisation de parasites vivants chez l'homme est délicate étant donné les risques de réactivation.

Prévention

En France, les recommandations hygiéno-diététiques de prévention sont les suivantes :

- Hygiène alimentaire : manger la viande bien cuite, ne pas manger de charcuterie crue, fumée ou salée, ne pas consommer de lait non pasteurisé, laver abondamment les fruits et les légumes destinés à être mangés crus, laver soigneusement les ustensiles de cuisine ainsi que les plans de travail.
- Hygiène corporelle : se laver les mains avec de l'eau et du savon avant les repas, avant de se toucher la bouche ou les yeux et après avoir manipulé de la viande crue, de la terre, de la litière pour chat.
- Précautions vis à vis des chats : éviter de s'occuper de la litière du chat soi-même ou porter des gants pour le faire, éviter tout contact avec du matériel qui a pu être en contact avec les matières fécales d'un chat, ne pas adopter de chats errants.
- Précautions concernant le mode de vie et les activités : éviter les voyages dans des zones de transmission importante, éviter le contact avec les endroits potentiellement contaminés par les excréments de chats (bacs à sable...), porter des gants pour jardiner et se laver les mains après.

B - Communication entre le parasite et la cellule-hôte

Les pathogènes intracellulaires tels que les virus, les bactéries ou les parasites sont capables de perturber toutes les grandes fonctions cellulaires de leurs hôtes. Les processus hôtes ciblés comprennent la synthèse protéique, le trafic membranaire, la modulation de l'expression génique, la présentation antigénique et l'apoptose.

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire obligatoire capable d'infecter toutes les cellules nucléées. Au cours de l'invasion des cellules, *Toxoplasma* crée un compartiment subcellulaire appelé vacuole parasitophore qui agit comme une interface entre le parasite et le cytoplasme de l'hôte et dans de nombreux cas, sert de plate-forme pour la modulation de voies de signalisation de la cellule-hôte. De nouvelles données révèlent aussi que *T. gondii* manipule les voies de signalisation de la cellule-hôte par le relargage de kinases et de phosphatases parasitaires dont au moins deux s'infiltrerent dans le noyau hôte.

Le parasite contrôle plusieurs voies de signalisation cellulaires pour créer un environnement anti-apoptotique et contourner la réponse immunitaire, remodèle le cytosquelette autour de la vacuole parasitophore pour favoriser l'acquisition de nutriments.

T. gondii est capable de manipuler le génome ainsi que le protéome de la cellule-hôte (Nelson *et al.*, 2008). Zeiner *et al.*, (2010), ont émis l'hypothèse que certains de ces changements observés dans l'expression des gènes seraient dus à une altération des niveaux de miRNA de l'hôte par *T. gondii*. Pour mieux comprendre ces changements, des DNA-microarrays ont été effectués pour analyser les modifications d'expressions des gènes de la cellule-hôte durant l'infection (Blader *et al.*, 2001). Les changements observés surviennent en deux vagues distinctes, la première, qui survient 2 heures après l'infection concerne de nombreux gènes intervenant dans la réponse pro-inflammatoire ainsi que des gènes codant pour des facteurs de transcription activés généralement en réponse au stress (EGR1, EGR2). L'activation de ces gènes pourrait permettre à la cellule-hôte de résister au stress causé par l'infection. Il est à noter que cette réponse n'est pas une réponse communément retrouvée lors de toute infection car ces gènes ne sont pas modulés lors d'une infection par *Trypanosoma cruzi* (Vaena De Avalos *et al.*, 2002) ou *Neospora caninum* par exemple (Phelps *et al.*, 2008). Ces résultats

suggèrent que l'activation parasitaire de ces facteurs de transcription serait initiée par une molécule dérivée du parasite lui-même. La deuxième vague inclut des gènes qui codent pour des protéines impliquées dans divers processus cellulaires. Certains gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, du mévalonate et du fer se trouvent up-régulés lors de l'infection (Blader *et al.*, 2001). De plus ces gènes sont impliqués dans des voies de signalisation conduisant à la synthèse de nutriments pour lesquels le parasite est auxotrophe. L'up-régulation de ces gènes est donc nécessaire pour augmenter l'apport de nutriments nécessaires au parasite.

I. La membrane de la vacuole parasitophore : organelle unique et dynamique

A l'interface entre le parasite et le cytoplasme de la cellule-hôte, la membrane de la vacuole parasitophore (MVP) est le siège de la plupart des interactions hôte-parasite observées. En effet, elle a un impact profond sur la réorganisation du cytosquelette de la cellule-hôte autour de la vacuole parasitophore (VP). De plus elle est impliquée dans le recrutement des mitochondries et du réticulum endoplasmique de la cellule-hôte, dans l'acquisition de nutriments pour lesquels *Toxoplasma* est auxotrophe (à travers des pores ou en séquestrant les lysosomes). Enfin, elle apparaît comme une plateforme impliquée dans la manipulation des voies de signalisation de la cellule-hôte (comme NF- κ B par exemple) et dans la signalisation parasitaire (phosphorylation de protéines de rhoptries comme ROP4 dans la MVP) (tableau2). Récemment, des analyses en protéomique ont mis en évidence des activités ubiquitine ligase dans la MVP (Martin *et al.*, 2007). Cette enzyme catalyse l'attachement de groupements ubiquitine aux protéines cibles ce qui a pour effet d'induire leur dégradation *via* le protéasome. La présence d'une telle activité à la MVP suggère la capacité du parasite à moduler le niveau de protéines de la cellule-hôte. Par exemple, le blocage de l'apoptose dans les cellules infectées pourrait être lié à l'élimination de facteurs pro-apoptotiques par une telle enzyme parasitaire.

Tableau 2. Activités de la membrane de la vacuole parasitophore de *T. gondii* (d'après Martin *et al.*, 2007).

Activités :
<p style="text-align: center;">Structurales</p> <p>Réorganisation des filaments intermédiaires de Vimentine autour de la MVP Réarrangement des microtubules de la cellule-hôte autour de la MVP Recrutement du MTOC (Microtubular Organization Center) à la MVP Extensions de la MVP : projections membranaires filiformes contenant plusieurs protéines GRA, émanant de la MVP et s'étendant le long des microtubules Recrutement et association de haute affinité des mitochondries de la cellule-hôte et de la MVP (médiée par ROP2) Recrutement et association de haute affinité du RE de la cellule-hôte et de la MVP</p>
<p style="text-align: center;">Acquisition des nutriments</p> <p><u>Nutriments solubles (nucléotides, acides aminés, sucres)</u> Les pores de la MVP permettent l'accès bidirectionnel libre dans le cytoplasme de la cellule-hôte pour des molécules <1300 Da. Cela inclut les nucléotides, les acides aminés et les sucres simples</p> <p><u>Capture des lipides</u> Association de la MVP et des mitochondries : acquisition de l'acide lipoïque de la mitochondrie de la cellule-hôte Association de la MVP et du Réticulum endoplasmique (RE) : le RE pourrait être une source potentielle de phospholipides et de stérols pour le parasite Détournement du LDL-cholestérol de l'hôte en utilisant un mécanisme dépendant des microtubules. GRA7 et d'autres protéines GRA pourraient jouer un rôle dans de détournement de cette voie</p>
<p style="text-align: center;">Manipulation de voies de signalisation</p> <p>La kinase parasitaire TgIKK située à la MVP joue un rôle dans la modulation temporelle de l'activation NF-κB ROP4, une protéine de rhoptrie membre de la famille ROP2, est phosphorylée par une kinase parasitaire ou de l'hôte dans les cellules infectées ROP2 et d'autres membres de la famille ROP2 sont localisés à la MVP et certaines possèdent une activité kinase. Les substrats potentiels de ces kinases ne sont pas connus à l'heure actuelle Des études menées en protéomique suggèrent que plusieurs kinases, ou phosphatases seraient localisées dans la MVP où elles pourraient interagir avec des voies de signalisation à la fois parasitaire et de l'hôte.</p>

II. Acquisition des nutriments

L'incapacité du parasite à proliférer *in vitro* en l'absence d'une cellule-hôte suggère qu'en plus de lui assurer une protection contre les agressions du système immunitaire, son

développement exclusivement intracellulaire lui permet d'obtenir des facteurs essentiels impossibles à obtenir dans le milieu extérieur. En effet, pour survivre et assurer sa prolifération, *T. gondii* doit acquérir des nutriments provenant de la cellule qu'il infecte. Le parasite est auxotrophe pour le tryptophane (Pfefferkorn, 1984), l'arginine (Fox *et al.*, 2004), les polyamines (Seabra *et al.*, 2004), les purines (Chaudhary *et al.*, 2004), le cholestérol (Coppens *et al.*, 2000), le fer (Gail *et al.*, 2004 et Dimier *et al.*, 1998) et d'autres lipides (Charron *et al.*, 2002).

Bien que le fait de s'entourer d'une vacuole parasitophore protège le parasite de l'acidification entraînée par le fusion avec des vésicules d'endocytose, cela le prive d'une abondante source de nutriments que représente la cellule-hôte. *T. gondii* acquiert les petites molécules à travers des pores dans la MVP qui permettent le passage de petits métabolites solubles (< 1300-1900 Da) comme le glucose, le fer, les acides aminés ou les nucléotides (Schwab *et al.*, 1994) (Figure 15).

ROP14, une protéine de rhoptries, possède de nombreux domaines transmembranaires habituellement retrouvés chez les protéines ayant des fonctions dans le transport. C'est pourquoi, ROP14 pourrait être impliquée dans la formation des pores associée à la diffusion de petites molécules dans la VP (El Hajj *et al.*, 2006). De la même façon les déchets cataboliques générés par le parasite sont probablement éliminés par cette voie dans le cytosol de la cellule-hôte.

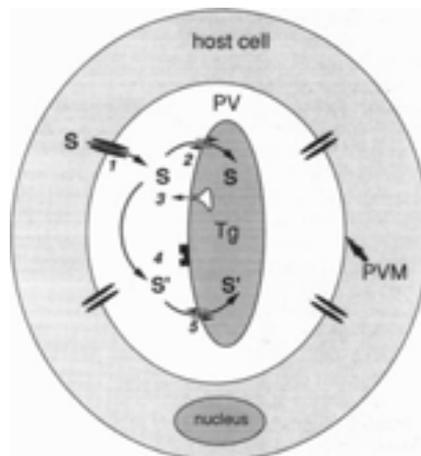


Figure 15 : Schéma d'acquisition potentielle des nutriments intracellulaires par *T. gondii*. Le parasite (Tg) réside dans une cellule hôte nucléée, entouré d'une vacuole parasitophore (PVM). Les pores non spécifiques (1) présents dans la PVM permettront l'échange rapide de petites molécules <1300-1900 Da (substrat S) entre le cytoplasme de la cellule-hôte et la vacuole parasitophore (PV). En entrant dans la PV, S peuvent être directement récupérés par le parasite (2) ou modifiés en S' soit par des protéines parasitaires sécrétées dans la PV (3) soit par des enzymes présentes sur la membrane plasmique parasitaire (4) avant d'être acheminés à travers la membrane plasmique du parasite (5) (Schwab *et al* 1994).

Dziadek *et al.*, (2007) ont observé que lors de l'infection par *T. gondii*, les protéines de la MVP, ROP2 et ROP4 étaient des ligands pour la lactoferrine saturée en fer de l'hôte et donc participaient à l'acquisition du fer par le parasite.

Cependant, certains métabolites sont retrouvés en faible quantité dans le cytoplasme, sont liés à de grosses protéines, ou sont insolubles et donc incapables d'être acquis par diffusion. La multiplication parasitaire rapide à l'intérieur de la cellule-hôte doit coïncider avec la biogenèse de membranes parasitaires et l'élargissement concomitant de la MVP ce qui requiert des quantités de lipides importantes. *T. gondii* a la capacité de synthétiser les phospholipides, mais il est également capable, aisément, de récupérer les précurseurs de ces lipides dans l'environnement pour élaborer des lipides plus complexes (Charron et Sibley, 2002; Gupta *et al.*, 2005). *T. gondii* détourne le LDL cholestérol qui transit par les lysosomes vers la VP en réorganisant les microtubules de la cellule-hôte (Coppens *et al.*, 2006). L'association entre la MVP et la mitochondrie et la MVP et le réticulum endoplasmique de la cellule-hôte pourrait représenter une zone d'échanges privilégiée de lipides entre le parasite et l'hôte. Les parasites déficients pour ROP2, protéine impliquée dans la rétention des mitochondries à la MVP, voient leur capacité à acquérir les lipides du cytosol de la cellule-hôte restreinte et finalement leur prolifération arrêtée (Nakaar *et al.*, 2003).

Crawford *et al.*, (2006) ont mis en évidence un déficit métabolique inattendu. Chez les eucaryotes, la production d'acide lipoïque, un des cofacteurs essentiels de deux enzymes intervenant dans le cycle de Krebs, la pyruvate déshydrogénase et la 2-oxoglutarate déshydrogénase, a lieu dans la mitochondrie. Au cours de l'évolution, la mitochondrie du parasite a perdu les gènes codant pour les enzymes responsables de cette production et celle-ci est assurée uniquement par l'apicoplaste. Malgré la synthèse *de novo* d'acide lipoïque dans l'apicoplaste (Thomsen-Zieger *et al.*, 2003), ce cofacteur n'est pas exocyté hors de l'apicoplaste. *T. gondii* obtient l'acide lipoïque de la cellule-hôte probablement par le contact étroit qui s'effectue entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique de l'hôte et la vacuole parasitophore (Crawford *et al.* 2006). Les folates et les acides gras peuvent être acquis de la cellule-hôte ou synthétisés *de novo* par *Toxoplasma* (Charron *et al.*, 2002, Massimine *et al.*, 2005). Ces exemples d'une exigence à la fois de synthèse parasitaire mais aussi d'acquisition à partir de la cellule-hôte, montrent que la présence dans le génome du parasite des gènes de biosynthèse de nutriments essentiels ne veut pas forcément dire que *Toxoplasma*

est prototrophe pour ces métabolites (Laliberté *et al.*, 2008).

Un autre élément important à prendre en compte est que l'hôte doit s'assurer d'avoir suffisamment de nutriments non seulement pour faire face aux besoins du parasite mais également pour lui-même. Les études menées par microarrays montrent une augmentation des gènes codant pour des enzymes glycolytiques et mévaloniques ainsi que pour le récepteur de la transferrine (Blader *et al.*, 2001). Ces gènes codent pour des protéines indispensables pour satisfaire les besoins nutritionnels du parasite mais permettraient aussi de moduler la quantité de nutriments présents dans les cellules infectées.

III. Manipulation du cytosquelette et des organelles de la cellule-hôte

III.1. Recrutement des mitochondries et du réticulum endoplasmique de la cellule-hôte

La membrane de la vacuole parasitophore forme des associations intimes avec les mitochondries et le réticulum endoplasmique de la cellule-hôte. Après 4 heures d'infection, 75% de la surface de la MVP est associée à ces organelles (Figure 16) (Sinai *et al.*, 1997).

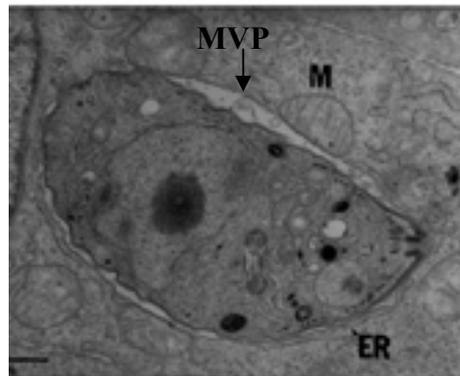


Figure 16 : Association du réticulum endoplasmique (ER) et des mitochondries (M) de la cellule-hôte avec la VP de *T. gondii* (Sinai *et al* 1997).

Cette association est dépendante de l'entrée active du parasite et, une fois instaurée, la viabilité des parasites n'est plus requise pour maintenir cette association. L'association de la MVP aux mitochondries est stable pendant les 20 premières heures de l'infection. Les mitochondries sont déformées et étirées le long de la MVP et il n'y a pas d'association de nouvelles mitochondries à la MVP avec son élargissement. Le pourcentage de surface de la MVP occupé par le réticulum endoplasmique diminue après 20 heures d'infection. Ceci suggère qu'il n'est pas aussi déformable que les mitochondries, ou que l'association est moins

stable. L'association de la MVP aux mitochondries n'impliquerait pas les microtubules de la cellule-hôte, il s'agirait d'une localisation de la vacuole dans la région péri-nucléaire où se localisent les mitochondries. La proximité des ces organelles avec la MVP est compatible avec une interaction protéine-protéine (Sinai *et al.*, 1997).

La protéine de rhoptries ROP2 est localisée dans la membrane de la vacuole parasitophore et sa partie NH₂-terminale, exposée dans le cytoplasme de la cellule-hôte, pourrait être responsable de l'interaction MVP-mitochondries (Beckers *et al.*, 1994, Sinai *et al.*, 2001). La séquence protéique de ROP2 ressemble à un signal d'importation mitochondrial. Elle est partiellement transloquée dans la membrane externe de la mitochondrie et se comporte comme une protéine intégrante de la membrane (Sinai *et al.*, 2001). Dans les cellules infectées avec des parasites déficients en ROP2, on observe un moindre recrutement des mitochondries à la MVP, une acquisition réduite des stérols, une diminution de l'invasion et de la division parasitaire, une atténuation de la virulence chez les souris et des perturbations dans la formation des rhoptries (Nakaar *et al.*, 2003) (Figure 17).

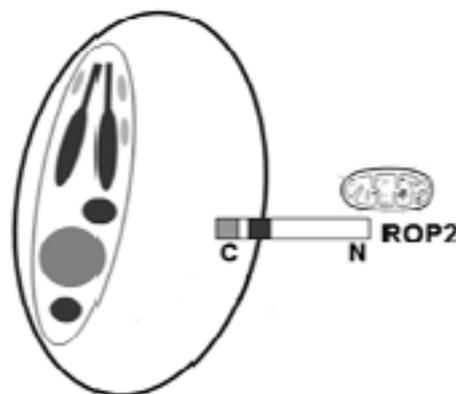


Figure 17 : Association des mitochondries et de la vacuole parasitophore (d'après El Hajj *et al.*, 2007)

Bien que les mécanismes de recrutement du réticulum endoplasmique ne soient pas bien connus, une étude récente montre que GRA3 et GRA5 y participeraient de par leur faculté à se lier aux protéines CAMLG (Calcium Modulating Ligand), qui sont des protéines de membrane du réticulum endoplasmique (Ahn *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2008). De plus, GRA3 et 5 sont toutes les deux ancrées dans la MVP par leur domaine transmembranaire et sont exposées au cytoplasme de la cellule-hôte (Figure 18).

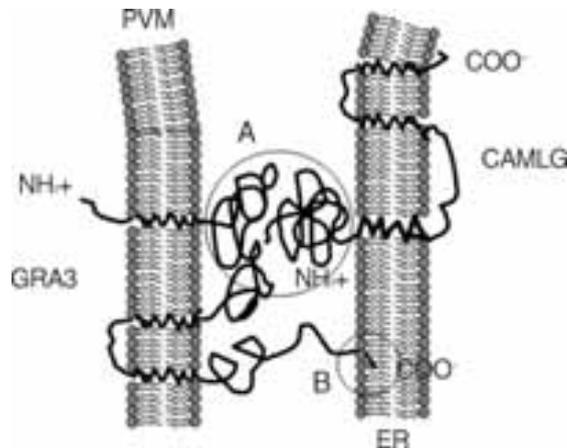


Figure 18 : Orientation schématique de GRA3 dans la PVM et des CAMLG dans le réticulum endoplasmique (ER) et interaction supposée entre les deux. (A) Interaction des domaines N-terminaux de GRA3 et CAMLG, les deux se faisant face dans le cytoplasme et (B) Interactions du domaine C-terminal de GRA3 avec la membrane du RE (Kim *et al.*, 2008).

L'association du réticulum endoplasmique à la MVP serait impliquée, entre autres, dans l'acquisition de nutriments et/ou dans la biogenèse de cette membrane. Goldszmid *et al* (2009) ont montré que l'interconnexion du réticulum et de la MVP forme une jonction par laquelle les antigènes parasitaires seraient sécrétés dans le réticulum endoplasmique-hôte pour être transformés et associés au CMH de classe I.

L'association de la mitochondrie à la MVP pourrait être une source de phospholipides. Ces phospholipides pourraient être intégrés à la MVP pour assurer l'extension de la VP durant le processus de division parasitaire. Bien que *T. gondii* soit capable de synthétiser certains phospholipides, il doit acquérir la choline et la sérine de la cellule-hôte pour assurer la synthèse de phosphatidylsérine et phosphatidylcholine nécessaires à sa réplication. La production de choline dans la cellule-hôte augmente en réponse à l'invasion et à la réplication parasitaire (Gupta *et al.*, 2005). Bien que le parasite synthétise l'acide lipoiqque dans l'apicoplaste, l'utilisation de ce lipide requiert son acquisition dans la cellule-hôte. Comme la plus grande partie de l'acide lipoiqque de l'hôte est mitochondrial, cela pourrait en partie expliquer l'ancrage de la mitochondrie à la MVP.

III.2. Réorganisation du cytosquelette et capture des lysosomes

L'infection par *Toxoplasma* entraîne une réorganisation des microtubules de la cellule-hôte autour de la vacuole parasitophore (Coppens *et al.*, 2006, Halonen *et al.*, 1994). Cette association joue un rôle dans le positionnement de la vacuole à proximité du noyau de la cellule-hôte. De plus, les microtubules sont capables de générer des forces mécaniques susceptibles de déformer les membranes phospholipidiques ; ainsi la polymérisation des microtubules pourrait induire des invaginations de la MVP. Le MTOC (Microtubular Organization Center) est également recruté du noyau à la MVP : il s'agit du centre cellulaire organisateur des microtubules à partir duquel les microtubules polymérisent et qui représente le point de ralliement des microtubules, lui forgeant alors un rôle primordial dans le trafic intracellulaire..

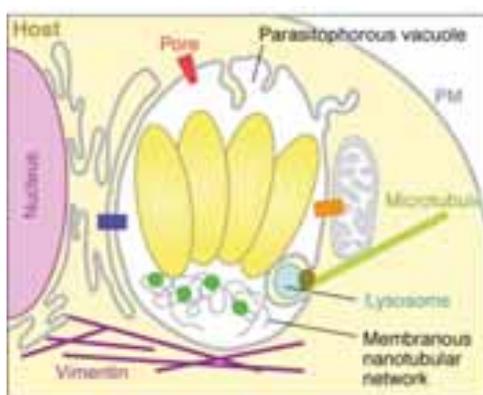


Figure 19 : Manipulation du cytosquelette et des organelles de la cellule-hôte. *Toxoplasma* recrute le RE et les mitochondries de la cellule-hôte. Les filaments de vimentine entourent la PV pour la maintenir à proximité du noyau hôte. Des pores dans la MVP permettent l'absorption des nutriments de petite taille. Le réarrangement des microtubules de la cellule-hôte est une voie possible pour internaliser les lysosomes dans la VP (Plattner *et al.*, 2008)

Le cholestérol de l'hôte est indispensable pour l'invasion et la réplication parasitaire (Coppens *et al.*, 2003). Les rhoptries sont des organelles riches en cholestérol et en phosphatidylcholine et déchargent leur contenu lors de l'invasion cellulaire en contribuant à la formation de la MVP. Le cholestérol de la cellule-hôte sera incorporé dans la vacuole

parasitophore et la déplétion en cholestérol de la membrane plasmique de la cellule-hôte bloque l'internalisation du parasite en réduisant le relargage des protéines de micronèmes et de rhoptries nécessaires à l'invasion (Coppens *et al.*, 2003). Bien que le rôle du cholestérol contenu dans les rhoptries ne soit pas connu, il pourrait servir à fluidifier la MVP lui conférant ainsi des propriétés particulières de déformabilité permettant d'accueillir la masse croissante de parasite lorsque celui-ci se divise.

Toxoplasma gondii ne synthétise pas son propre cholestérol et utilise celui de la cellule-hôte. Bien que la cellule-hôte synthétise du cholestérol dans son réticulum endoplasmique, ce n'est pas de cette source que le parasite l'obtient. Une autre source importante de cholestérol implique les LDL (Low-density lipoprotein) qui sont internalisées dans la cellule et délivrées aux lysosomes pour hydrolyse. Cette voie est considérablement augmentée durant la réplication parasitaire. De plus, les vésicules d'endocytose et les lysosomes occupent normalement la région péri-nucléaire or, dans les cellules infectées, après 48 heures, ces vésicules sont observées à proximité de la vacuole parasitophore et leur nombre augmente avec l'augmentation de surface de la vacuole (Coppens *et al.*, 2006). Le parasite est capable d'intercepter les vésicules endo-lysosomales chargées en cholestérol (Coppens *et al.*, 2000). L'absence de fusion entre les vésicules d'endocytose et la VP suggère un autre moyen de transport de ces vésicules dans la VP. Coppens *et al.*, (2006) ont montré que ces vésicules étaient transloquées le long des microtubules de la cellule-hôte et délivrées intactes dans la vacuole parasitophore. De plus, les microtubules de la cellule-hôte induisent des invaginations de la MVP dans la lumière de la VP et cette structure, appelée HOST (host organelle sequestering tubulo structures) sert de conduit pour délivrer les vésicules d'endocytose à l'intérieur de la VP (Coppens *et al.*, 2006). Ces invaginations d'un diamètre de 95-115 nm contiennent un réseau de microtubules et sont stabilisées par la formation d'un manteau de protéines d'origine parasitaire et notamment de GRA7. Malgré l'absence d'un domaine conventionnel de liaison aux lipides habituellement impliqué dans le remodelage des membranes, GRA7 présente une affinité pour les lipides chargés négativement et son domaine transmembranaire est nécessaire pour la liaison aux lipides. De par ses capacités à se lier et à tubuler les membranes, GRA7 entraînerait une constriction du conduit afin de séquestrer les vésicules à l'intérieur de la VP (Coppens *et al.*, 2006) (Figure 20).

Deux hypothèses ont été émises pour expliquer le transfert du cholestérol au parasite : 1) la membrane extérieure de la structure HOST pourrait fusionner directement avec la membrane plasmique du parasite pour libérer les vésicules à l'intérieur du parasite ou 2) les vésicules

d'endocytose pourraient transporter le cholestérol dans l'espace inter-membranaire de la structure HOST, où il pourrait alors traverser la MVP et gagner la lumière de la VP (Coppens *et al.*, 2006)

On peut penser que d'autres nutriments essentiels pourraient être acquis par le parasite par l'endocytose et la structure HOST. Le fer par exemple, est un facteur limitant de la croissance parasitaire. Dans les cellules infectées l'expression des récepteurs membranaires de la transferrine sont up-régulés (Gail *et al.*, 2004) suggérant un mécanisme d'endocytose pour l'acquisition du fer.

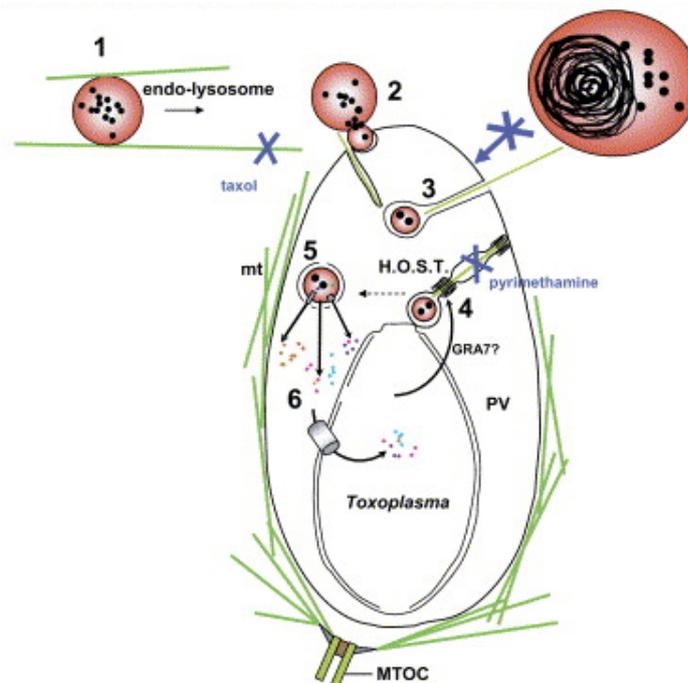


Figure 20 : Acquisition du cholestérol. Les endo-lysosomes sont transportés à proximité de la PV, le long des microtubules (1) et sont alors étroitement apposés à la PVM (2) avant l'internalisation dans la PV *via* le HOST (3). Ces conduits sont stabilisés par des protéines parasitaires sécrétées, notamment GRA7 (4), entraînant une constriction de la PVM et la séquestration des endo-lysosomes (5). Les molécules intralysosomales produites par hydrolyse peuvent traverser la membrane lysosomale, par des transporteurs spécifiques. Une fois dans l'espace vacuolaire, les molécules peuvent être transportées à travers la membrane plasmique des parasites par des transporteurs spécifiques (6). L'étape 1 est inhibée par les inhibiteurs de microtubules, l'étape 3 est bloquée par des agents qui interfèrent avec la fonction lysosomale, et l'étape 4 est inhibée par des médicaments antiparasitaires (Coppens *et al.*, 2006).

Contrairement aux microtubules, les filaments d'actine ne sont pas réorganisés durant la réplication parasitaire. Cependant, lors de l'invasion, le parasite doit traverser le cytosquelette d'actine de la cellule-hôte, probablement en formant une brèche dans le réseau ou en le démantelant localement. Un candidat pourrait être un microfilament antagoniste appelé

toxofiline, qui réside dans les rhoptries (Bradley *et al.*, 2005, Poupel *et al.*, 2000). Cette protéine coiffe les microfilaments et se lie à l'actine globulaire la rendant indisponible pour la polymérisation.

IV. Modification des voies de signalisation de l'apoptose

L'induction de l'apoptose est un phénomène communément observé en réponse à une infection par des virus, des bactéries ou des pathogènes eucaryotes. De cette façon, l'hôte infecté peut réduire la réplication et la propagation du pathogène. Il n'est donc pas surprenant de constater que certains microorganismes, incluant *T. gondii*, ont développé des stratégies pour contourner l'élimination par apoptose (Nash *et al.*, 1998). Le blocage de l'apoptose permet au parasite d'échapper à la clairance rapide par les macrophages qui sont activés par des signaux émis par les cellules apoptotiques. De plus, le parasite doit maintenir l'intégrité de la cellule qui l'héberge pour obtenir les nutriments pour lesquels il est auxotrophe.

L'apoptose peut être induite par des stimulations intra ou extra cellulaires. Dans les deux cas, le processus apoptotique implique l'activation d'une cascade de cystéines protéases appelées caspases. Les caspases sont classifiées en deux groupes : les caspases initiatrices et effectrices. Les caspases initiatrices agissent en amont de la voie apoptotique et sont responsables de l'amplification initiale du signal. Les caspases effectrices agissent en aval pour cliver les protéines-cibles spécifiques, ce qui conduira à une désorganisation du noyau, une dégradation de l'ADN, une désorganisation du cytosquelette, une altération de la surface cellulaire et à la formation de corps apoptotiques phagocytés par les cellules environnantes. (Earnshaw *et al.*, 1999).

T. gondii entrave l'apoptose de la cellule-hôte induite par l'exposition à un grand nombre d'inducteurs comme les UV, l'exposition à des toxines, l'irradiation gamma, le manque de facteurs de croissance (Nash *et al.*, 1998). Ceci implique que le parasite agisse sur des effecteurs communs ou inhibe plusieurs éléments des différentes voies conduisant à l'apoptose.

IV.1. Manipulation de la voie apoptotique extrinsèque par *T. gondii*

L'apoptose est gouvernée par deux voies principales d'activation (Figure 21). La voie dite extrinsèque, implique des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs du TNF, ou du récepteur Fas. L'activation de ces récepteurs entraîne l'assemblage des composants du complexe DISC (Death-inducing signaling complex). Celui-ci permet le recrutement et l'activation de la caspase initiatrice 8 qui elle-même entraîne l'activation de la caspase 3. Ces différentes protéases effectuent le clivage de plusieurs molécules, parmi lesquelles des protéines de structure et des protéines impliquées dans les dispositifs de réparation cellulaire. Il existe 2 voies de transduction du signal de la voie Fas, dépendant du type cellulaire. Dans les cellules de type 1 comme les thymocytes, la caspase 8 active directement la caspase 3. Dans les cellules de type 2 comme les hépatocytes, la caspase 8 active Bid (facteur pro-apoptotique), provoquant la libération du cytochrome C. L'association cytochrome C/APAF1 active la caspase 9 qui active à son tour la caspase 3 (Scaffidi *et al.*, 1998, et 1999, Li *et al.*, 1998). L'induction de la voie extrinsèque de l'apoptose est inhibée par *T. gondii* via la dégradation de la caspase 8 (Vutova *et al.*, 2007). En effet, les cellules infectées par *Toxoplasma* présentent un taux plus faible de caspase 8 et une moindre activité de cette protéine apparemment *via* un clivage protéolytique et une dégradation médiés par le parasite.

IV.2. Manipulation de la voie apoptotique intrinsèque par *T. gondii*

La deuxième voie est dite intrinsèque. Elle peut être induite par le stress ou des dommages cellulaires et implique la mitochondrie. Activée, elle conduit à un relargage du cytochrome c dans le cytoplasme. Celui-ci se lie et active le complexe de l'apoptosome. Il est formé à partir d'une protéine APAF1, de deux procaspase-9 et de deux protéines C libérées par la mitochondrie. Une fois le complexe formé, il permet la libération de la caspase 9 qui jouera un rôle dans la l'apoptose.

Les cellules infectées par *T. gondii* présentent un faible relargage du cytochrome C après l'induction de la voie mitochondriale de l'apoptose (Carmen *et al.*, 2006, Keller *et al.*, 2006).

La perméabilité de la membrane extérieure de la mitochondrie est contrôlée par le ratio protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 qui sont localisées dans la membrane de la mitochondrie. La diminution du relargage du cytochrome C est corrélée à la dégradation sélective de protéines pro-apoptotiques comme Bad et Bax accompagnée par une augmentation de la transcription de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bfl-1 (Molestina *et al.*, 2003, Carmen *et al.*, 2006, Goebel *et al.*, 2001). Le recrutement des mitochondries à la MVP pourrait jouer un rôle direct dans le blocage de la voie apoptotique intrinsèque. *T. gondii* serait également capable d'inhiber l'activation de la caspase 9 par une inhibition directe de l'apoptosome. Il sécréterait des facteurs qui apparaissent comme étant capables de limiter l'activation des caspase 3 et 7, ceci impliquant certainement des protéines de rhoptries ou de granules denses (Keller *et al.*, 2006).

IV.3. Rôle de la voie impliquant NF- κ B

NF- κ B est un facteur de transcription qui régule des protéines anti-apoptotiques de la famille des Bcl2 et de nombreuses protéines cellulaires inhibitrices de l'apoptose, les c-IAPs (cellular inhibitors of apoptosis proteins) qui agissent directement sur la perméabilité de la mitochondrie ainsi que des facteurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. L'induction de NF- κ B est généralement associée à une réponse de survie de la cellule. p50, p65, p52 et RelB, membres de la famille de NF- κ B, sont retrouvés dans le noyau de la cellule-hôte après l'infection par *T. gondii* (Molestina *et al.*, 2003). L'infection par *Toxoplasma* des fibroblastes déficients en p65 ne protège pas ces cellules de l'apoptose lors de la stimulation par des inducteurs de l'apoptose (Payne *et al.*, 2003). Habituellement, les cellules infectées par *T. gondii* présentent des caspases 3, 8 et 9 inactives mais une activité de ces caspases a été détectée dans les cellules déficientes en p65. Cette observation montre l'importance de NF- κ Bp65 comme facteur contribuant au maintien d'un environnement anti-apoptotique dans les cellules infectées par *T. gondii*.

IV.4. Rôle de la voie des PI3 kinases

Le maintien d'un état anti-apoptotique dans les cellules de mammifères repose également sur l'activation de la voie de signalisation de la phosphoinositol 3 kinase (PI3K). Cette activation

augmente les niveaux de PIP2 (phosphatidylinositol-3-4 biphosphate) et de PIP3 (phosphatidylinositol-3-4-5 triphosphate) à la membrane plasmique conduisant au recrutement d'une kinase PKD1 (phosphoinositide-dependant kinase 1) qui elle-même phosphoryle et active une autre kinase, Akt/PKB. Celle-ci phosphoryle et inactive la caspase 9 et la protéine pro-apoptotique Bad (Blume-Jensen *et al.*, 1998) et supprime l'expression de deux autres facteurs pro-apoptotiques Bim et FasL en inactivant le facteur de transcription FKHR1 (forkhead transcription factor) (Datta *et al.*, 1999). Kim *et al.*, (2006) ont relié l'inhibition de l'apoptose dans les cellules infectées à l'activation de la voie des PI3 kinases. Durant les premiers stades de l'infection, les cellules infectées présentent une phosphorylation élevée de la kinase Akt/PKB (Kim *et al.*, 2006).

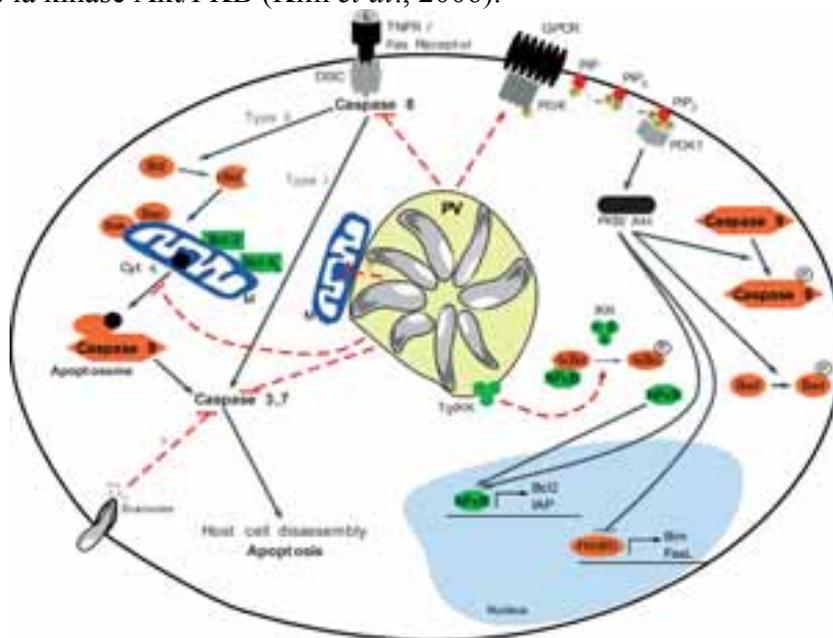


Figure 21 : *T. gondii* influence l'apoptose de la cellule-hôte. L'inactivation des caspases 8 et 9, ainsi que des caspases 3 et 7, est observée après l'invasion par *T. gondii*. L'induction de l'apoptose dans les cellules-hôtes types I et II, via le récepteur de facteur de nécrose tumorale (TNFR) et les récepteurs de mort Fas, est inhibée par *T. gondii* et ce par la dégradation de la caspase 8. L'infection par *T. gondii* retarde la libération du cytochrome C des mitochondries. Des protéines parasitaires libérées lors de l'invasion pourraient être impliquées dans l'inhibition des caspases 3 et 7. Dans certaines cellules, le facteur de transcription NF-κB est transloqué dans le noyau après l'infection ; cela favorise l'expression de protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) et anti-apoptotiques de la famille Bcl2. La phosphorylation d'IκBα serait impliquée dans l'activation de NF-κB. L'activation de la voie des PI3Kinases dans les cellules infectées conduit à l'inactivation du facteur pro-apoptotique Bad, l'inhibition du facteur de transcription FKHR1 et à l'activation de la voie NF-κB (Laliberté *et al.*, 2008).

L'infection des cellules par les tachyzoïtes de *T. gondii* conduit à la lyse de ces cellules en 48 à 72 h pour infecter les cellules avoisinantes. Quel serait alors l'intérêt pour le parasite

d'inhiber l'apoptose dans les cellules infectées ? Une réponse pourrait être que la modulation des voies apoptotiques affecterait la progression de la réponse immunitaire *in vivo*. Les cellules apoptotiques sont rapidement prises en charge par les macrophages pour être détruites. La prévention de l'apoptose dans les cellules infectées préviendrait l'élimination des cellules infectées par les macrophages activés. Une autre hypothèse serait que comme *T. gondii* est auxotrophe pour plusieurs métabolites, cela pourrait induire une diminution de la quantité de certains nutriments. Or la privation en certains nutriments dans la cellule est un signal d'apoptose. De plus, une cellule apoptotique est un pauvre prestataire de métabolites critiques pour le parasite en prolifération. Enfin, l'inhibition de l'apoptose serait critique pour la phase chronique de l'infection. En effet, les bradyzoïtes mûrissent dans la cellule infectée (Sinai *et al.*, 2004).

V. Manipulation des facteurs de transcription

Les changements dans l'expression des gènes de la cellule-hôte sont les changements les plus communs et répandus après une infection. Pour comprendre leur importance dans les cellules infectées par *T. gondii*, beaucoup d'équipes ont utilisé le DNA microarray pour examiner les changements dans l'abondance des transcrits après l'infection (Blader *et al.*, 2001 ; Gail *et al.*, 2001). Ces expériences montrent que plus de 1000 gènes de la cellule-hôte sont modulés. Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans plusieurs mécanismes comme l'inflammation, l'apoptose, le métabolisme, la prolifération cellulaire et la différenciation. Ces gènes ont d'abord été classés en 3 groupes distincts : a) « pro-hôte » : gènes nécessaires pour les défenses de l'hôte, b) « pro-parasite » : gènes-hôtes nécessaires pour la croissance du parasite et c) « bystander » : gènes-hôtes accidentellement régulés en conséquence de la modulation des gènes des deux premières classes (Blader *et al.*, 2001).

V.1. NF- κ B

Le nuclear factor- κ B (NF- κ B) est un facteur de transcription, élément central de l'immunité innée et adaptative, responsable de l'activation de plusieurs gènes requis dans des situations comme les infections, le stress ou les dommages cellulaires. Il exerce une forte pression

sélective sur les agents infectieux. C'est pourquoi de nombreux parasites, bactéries et virus ont développé des stratégies pour moduler cette voie de signalisation et promouvoir leur survie (Tato et Hunter, 2002).

La famille de NF- κ B est composée de 5 membres : p50 (NF κ B1), p52 (NF κ B2), p65 (RelA), RelB et c-Rel (Ghosh *et al.*, 1998). Dans des cellules non stimulées, les homo ou les hétéro-dimères de NF- κ B sont séquestrés dans le cytoplasme par une famille d'inhibiteurs appelés I κ B. L'activation de NF- κ B est initiée par la dégradation de I κ B. Ceci se produit par l'activation de kinases appelées I κ B kinases (IKK). Une fois activées, les IKK phosphorylent deux résidus sérine d'I κ B qui est ensuite ubiquitinylé et dégradé par le protéasome. Le complexe NF- κ B est donc libre et transloqué dans le noyau où il peut induire l'expression de gènes spécifiques qui possèdent des sites de liaison pour NF- κ B sur leur promoteur. NF- κ B régule la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la survie cellulaire, l'adhésion cellulaire, l'inflammation, la réponse cellulaire au stress et le remodelage tissulaire (Perkins *et al.*, 2007). NF- κ B contrôle notamment l'expression de gènes contrôlant des cytokines pro-inflammatoires (IL-12, TNF α) (Baeuerle *et al.*, 1994). Il induit également l'expression de gènes pouvant inhiber l'apoptose ; c'est le cas de c-IAP, des membres de la famille Bcl-2 et TRAF1 et 2 (TNF-receptor-associated factors 1 and 2) (Karin *et al.*, 2002).

NF- κ B est un facteur de transcription dont l'activité est modulée par l'infection. 85% des gènes régulés par NF- κ B sont up-régulés lors de l'infection par *T. gondii*. Cela inclus IL-6, IL-1, ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecule 1) et IRF-1 (interferon regulatory factor 1).

Bien que la modulation de NF- κ B par *Toxoplasma* fasse débat, l'intérêt pour ce facteur de transcription est dirigé par deux découvertes indépendantes. Premièrement, NF- κ B est impliqué dans la résistance à l'infection. En effet, les souris déficientes pour certains membres de la famille de NF- κ B (NF- κ B2 et RelB) sont plus susceptibles à l'infection (Caamano *et al.*, 1999 ; et Caamano *et al.*, 2000). NF- κ B2 est impliqué dans la régulation de l'apoptose des lymphocytes infectés et est requi pour le maintien à long terme de l'immunité adaptative (Caamano *et al.*, 2000). RelB quand à lui est indispensable au développement de l'immunité innée et adaptative conduisant à la production d'IFN- γ et aux mécanismes de résistance anti-parasitaire (Caamano *et al.*, 2000). Deuxièmement, le parasite prévient l'apoptose des cellules

infectées par l'expression de gènes anti-apoptotiques et cela sous la dépendance de NF- κ B (Molestina *et al.*, 2003).

Dans les cellules infectées, on remarque une augmentation de I κ B α sous sa forme phosphorylée (Butcher *et al.*, 2001, Molestina *et al.*, 2003). Alors qu'il y a débat sur la corrélation entre le taux de I κ B α et la localisation nucléaire de NF- κ B pour des temps courts d'infection, il existe un consensus selon lequel après 20 heures d'infection, *T. gondii* entraîne une translocation nucléaire de NF- κ B ainsi que son activation, conduisant à une up-régulation de gènes-cibles ayant une fonction anti-apoptotique ou pro-inflammatoire ou dans la survie cellulaire (Molestina *et al.*, 2003, Sinai *et al.*, 2004 Kim *et al.*, 2001, Payne *et al.*, 2003). De façon intéressante, l'activation de NF- κ B lors de l'infection est corrélée avec la localisation au niveau de la MVP d'I κ B α (Molestina *et al.*, 2003). La seule kinase connue pour phosphoryler I κ B α sur les résidus sérine 32 et 36 est IKK. *Theileria parva*, parasite protozoaire, est capable de recruter IKK à sa surface où elle sera activée et ainsi assurer la translocation nucléaire de NF- κ B (Heussler *et al.*, 2002, Dobbelaere et Rottenberg, 2003). Il a donc été suggéré que *T. gondii*, de la même manière, recrutait IKK de la cellule-hôte à la MVP. Le complexe IKK est formé de deux sous-unités catalytiques IKK α et IKK β et d'une sous-unité régulatrice IKK γ (Ghosh et Karin 2002). Étonnamment, l'accumulation de I κ B α phosphorylé à la MVP dans les cellules infectées n'est pas causé par le recrutement ni de IKK α , ni de IKK β car, contrairement à *Theileria*, IKK α et β n'ont pas été retrouvées au niveau de la MVP. De plus, la phosphorylation d'I κ B α retrouvée autour de la MVP se fait en l'absence du complexe IKK actif. En effet, I κ B α phosphorylé est retrouvé autour de la MVP dans des cellules IKK α -/-, IKK β -/- et double knock-out (Molestina *et al.*, 2005). Par contre IKK est requis pour stimuler la phosphorylation maximale du pool de I κ B α non associé à la MVP. Enfin, une activité IKK parasitaire dirigée contre les sérines 32 et 36 de I κ B α et appelée TgIKK a été mise en évidence (Molestina *et al.*, 2005) et elle se localise au niveau de la MVP.

En réalité, l'activation de NF- κ B dans les cellules infectées est un phénomène plus complexe qui met en jeu à la fois le complexe IKK de l'hôte au début de l'infection et TgIKK pour favoriser l'augmentation d'expression des gènes (Molestina *et al.*, 2005). En effet, les plus hauts niveaux d'I κ B α phosphorylée retrouvés autour de la MVP sont observés après 18 heures d'infection (75 à 100% de la vacuole est décorée d' I κ B α phosphorylée entre 18 et

24 h d'infection contre 25 à 75 % entre 6 et 9 h d'infection). L'activité de TgIKK est corrélée à la réplication du parasite (Molestina *et al.*, 2005) et l'absence précoce d'activité de TgIKK durant l'infection suggère que la translocation de NF- κ B à ce stade implique le complexe IKK de l'hôte.

Molestina *et al.*, (2005) ont proposé le modèle suivant : la première étape de l'infection déclenche l'activation du complexe IKK de l'hôte ; il en résulte une première vague de translocation de NF κ B dans le noyau et l'induction de l'expression de gènes régulés par NF- κ B, puis avec la progression de l'infection, l'activité TgIKK à la MVP déclenche une deuxième vague d'activation de NF- κ B. La présence d'une boucle d'amplification par un mécanisme autocrine, comme ceux rapportés pour *Theileria*, n'est pas exclue pour maintenir un niveau d'activation de NF- κ B suffisant dans les phases tardives de l'infection (Figure 22).

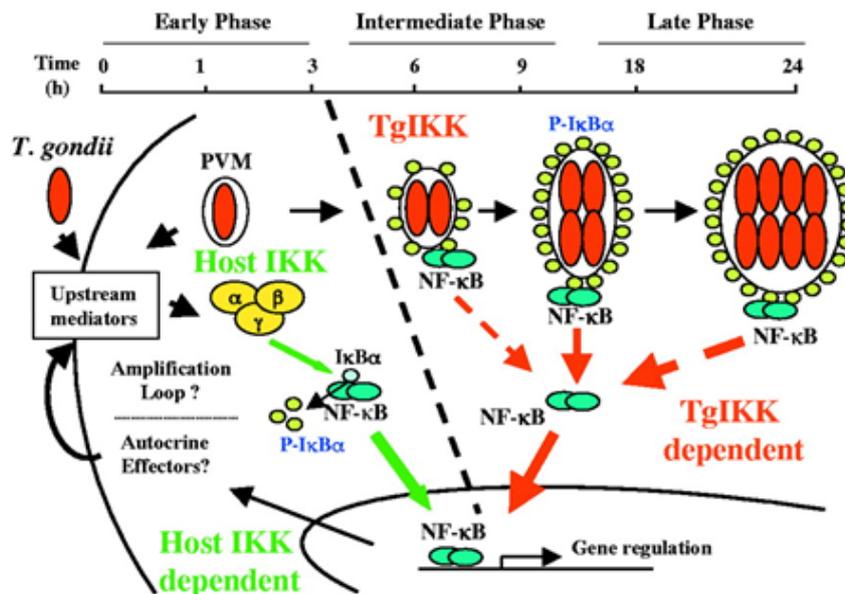


Figure 22. Modèle représentant la modulation de l'expression de NF- κ B dans les cellules infectées. Au début de l'infection, le parasite déclenche l'activation du complexe IKK hôte, entraînant une onde primaire de translocation de NF- κ B dans le noyau et l'activation de celui-ci. Une augmentation de l'activité TgIKK à la MVP phosphoryle I κ B α , induisant une seconde vague d'activation de NF- κ B. L'ampleur de cette réponse pourrait dépendre également d'une boucle d'amplification par le biais d'effecteurs autocrines (TNF- α , IL-1), résultant en des niveaux soutenus d'expression des gènes à un stade avancé de l'infection. (Molestina *et al.*, 2005).

L'activation de NF- κ B serait un élément crucial pour déclencher un signal de survie dans les cellules-hôtes en stimulant l'expression de gènes anti-apoptotiques. Elle est corrélée avec

l'up-régulation de gènes anti-apoptotiques (Bcl2, IAP). De plus, dans les cellules épithéliales infectées, une translocation de NF- κ B induisant une production de cytokines pro-inflammatoires comme IL-8 et MCP1 a été décrite (Kim *et al.*, 2001). Cette réponse entraînerait un afflux des neutrophiles, monocytes, macrophages et lymphocytes au site d'infection et participerait au contrôle de l'infection (exacerbation de la réponse immunitaire ou dissémination accrue du pathogène à l'intérieur de l'hôte) (Molestina *et al.*, 2003). L'activation de NF- κ B par *Toxoplasma* est controversée. Les souches de type I peuvent transitoirement bloquer la translocation de NF- κ B dans le noyau dans les macrophages murins et les fibroblastes humains. Cependant, l'activation des IKK et la dégradation de I κ B ne sont pas inhibées (Shapira *et al.*, 2005). Ceci pourrait être expliqué par le fait que dans ces cellules, la translocation de NF- κ B serait sous la dépendance d'autres inhibiteurs d'I κ B comme I κ B β ou I κ B ϵ . Ce blocage de la translocation de NF- κ B entraîne une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire comme IL-12 p40 et le TNF- α , ce qui serait bénéfique au parasite pour permettre une division et une multiplication suffisante des tachyzoïtes pour qu'un certain nombre d'entre eux survive à l'attaque du système immunitaire et forme des kystes pour assurer la persistance du parasite dans l'hôte. Shapira *et al.*, (2005) qui ont montré que, dans les fibroblastes humains infectés par la souche de type I RH, IKK de l'hôte était activée et que I κ B était dégradée. Cependant, ils n'ont pas observé de translocation de NF- κ B dans le noyau, ni d'activation des gènes régulés par NF- κ B. Ceci ne serait pas la conséquence d'un blocage de l'import nucléaire mais d'une phosphorylation réduite de p65/RelA (événement impliqué dans la capacité d'NF- κ B à transloquer dans le noyau et à se lier à l'ADN).

V.2. STAT

Les protéines STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) sont impliquées dans la régulation de différents processus cellulaires telles la croissance, la différenciation, la survie ou l'apoptose et dans la régulation de la réponse immunitaire. Elles sont activées par phosphorylation qui conduit à leur dimérisation et à leur entrée dans le noyau où elles ont un rôle de facteur de transcription.

V.2.1. STAT1

IFN- γ est un élément indispensable à la cellule-hôte pour le contrôle de l'infection et l'induction de la conversion en bradyzoïtes. La capacité du parasite à bloquer l'activation de l'IFN- γ est une des clés pour assurer sa persistance dans la cellule-hôte. L'IFN- γ se lie à son récepteur exprimé à la surface des cellules et qui se trouve associé avec JAK1 et 2 qui vont phosphoryler STAT1 sur une tyrosine. STAT1 phosphorylé forme des homodimères qui sont transloqués dans le noyau et initient la transcription des gènes-cibles de l'IFN- γ . Une phosphorylation supplémentaire sur la sérine 727 est essentielle pour une activité transcriptionnelle maximale (Varinou *et al*, 2003). En utilisant le microarray, Kim *et al* (2007) ont observé une dérégulation complète des gènes induit par IFN- γ dans les fibroblastes infectés par *T. gondii*.

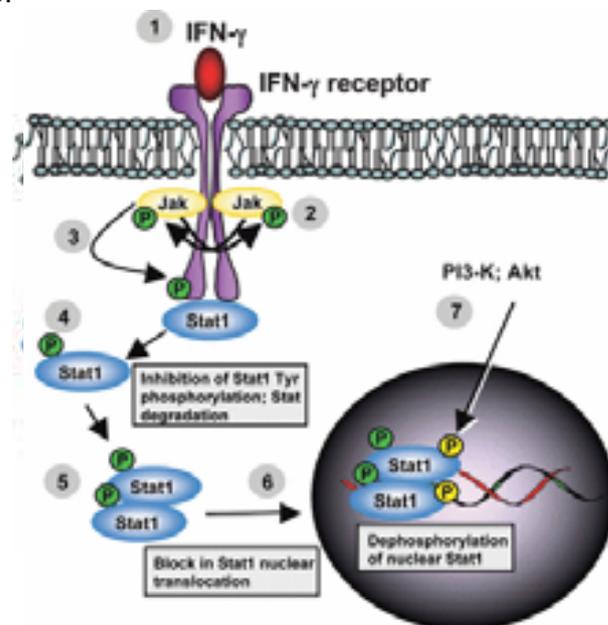


Figure 23 : Modulation de la voie de signalisation de STAT1 par *T. gondii*. 1) La liaison de l'IFN- γ cause la dimérisation (2) des molécules JAK qui se phosphorylent entre elles et induisent le recrutement et la phosphorylation de STAT1 (3). STAT1 activé se dissocie de son récepteur et se dimérise dans le cytosol (5) puis est transloqué dans le noyau (6) où il se lie aux promoteurs des gènes qu'il régule. L'activité maximale de STAT1 exige également une deuxième phosphorylation sur une sérine. Cette phosphorylation est dépendante de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) et de la protéine kinase B / Akt (7) (Leng *et al.*, 2009).

Plusieurs études suggèrent que le parasite interfère avec STAT1, mais le point de contrôle du parasite sur cette voie de signalisation est peu clair.

Dans les macrophages infectés par une souche de type I, le parasite induit une dégradation de la protéine STAT1 et une diminution de la phosphorylation de STAT1 (Zimmermann *et al.*,

2006).

D'autres études suggèrent que le parasite bloque la translocation nucléaire de STAT-1 dans les macrophages qui ne peuvent donc pas produire d'IL-12 ou de TNF- α (Denkers *et al.*, 2003). A l'opposé, l'infection par une souche de type II inhibe l'expression des gènes induits par l'IFN- γ sans affecter la stabilité de la protéine (Lang *et al.*, 2006). Contrairement aux premières observations, Kim *et al.* (2007) n'ont observé aucune dégradation de STAT1 après l'infection par une souche de type I ou II malgré l'absence de régulation de ces gènes-cibles. Très tôt après l'infection, STAT1 est retrouvé dans le noyau des cellules infectées, indiquant que la phosphorylation sur la tyrosine 701 par les JAK a bien eu lieu dans le cytoplasme et a induit la translocation de STAT1 dans le noyau. Cependant, dans le noyau, tout le pool de STAT1 n'apparaît pas entièrement phosphorylé sur la tyrosine 701 suggérant que l'infection causerait une déphosphorylation de STAT1 après que celui-ci ait été transloqué dans le noyau. Ceci pourrait réguler négativement l'activité de STAT1 car la phosphorylation de la tyrosine est essentielle pour une liaison étroite avec l'ADN. Malgré tout, cette déphosphorylation est dépendante de la souche parasitaire utilisée et ne peut expliquer à elle seule le défaut d'expression de STAT1 observé dans toutes les cellules. Une protéine parasitaire présente dans le noyau pourrait interférer avec l'activité de STAT1. Ceci pourrait, par exemple, faire intervenir ROP16 et PP2C, deux protéines de rhoptries qui sont retrouvées dans le noyau.

V.2.2. STAT3 et STAT6

L'infection par *T. gondii* régule négativement la réponse immunitaire de l'hôte, comme la production de cytokines pro-inflammatoires de façon STAT3 dépendante.

La voie de signalisation IL-10/STAT3 est impliquée dans le contrôle de médiateurs pro-inflammatoires comme IL-12 et le TNF- α . La cascade de signalisation impliquant l'IL-10 commence par l'activation de JAK1 et le recrutement de STAT3. JAK1 phosphoryle STAT3 sur la tyrosine 705 et STAT3 phosphorylé forme des dimères qui sont transloqués dans le noyau. STAT3 est essentiel pour l'activité immunosuppressive de l'IL-10. *T. gondii* exploite STAT3 pour réguler négativement l'expression d'IL-12 et le TNF- α dans les macrophages (Butcher *et al.*, 2005). La phosphorylation de STAT3 a lieu dans les 2 minutes suivant l'infection et se poursuit 22 heures après. L'activation de STAT3 dans les cellules infectées est indépendante de l'IL-10 de la cellule-hôte.

Par une approche génétique dans laquelle des souches de type II et III ont été croisées, Saeij *et*

al., (2006 et 2007) ont identifié la protéine de rhoptries ROP16 comme responsable de l'activation de STAT3. ROP16 se lie à STAT3 par sa partie N-terminale et induit la phosphorylation directe de STAT3 sur la tyrosine 705 (Yamamoto *et al.*, 2009).

De la même manière, un autre membre de la famille des STAT, STAT6 est activé durant la phase précoce de l'infection par l'intermédiaire de ROP16 (Saeij *et al.*, 2007) et ceci conduirait à la suppression d'IL-12 dans les macrophages, qui est essentielle pour le développement d'une réponse immunitaire de type Th1.

V.3. HIF1

L'infection par *T. gondii* augmente l'abondance des transcrits codant pour des enzymes glycolytiques, des transporteurs du glucose, des récepteurs à la transferrine et du VEGF (vascular endothelial growth factor) (Blader *et al.*, 2001). L'expression de ces gènes est contrôlée par le facteur de transcription HIF1 (Hypoxia inductible factor 1).

HIF1 est un hétérodimère formé de deux sous-unités α et β . HIF1 α , dans des conditions basales, est synthétisé mais immédiatement dégradé par le protéasome et donc n'est pas détecté dans les cellules non stimulées. A l'opposé, l'expression de HIF1 β est constitutive (Huang *et al.*, 1996, Salceda et Caro, 1997). Comme le ciblage de HIF α par le protéasome est dépendant de la concentration en oxygène, les niveaux de HIF1 α sont rapidement up-régulés dans les cellules en l'hypoxie. HIF1 peut être aussi activé dans des conditions de normoxie par les cytokines (Hellwig-Burgel *et al.*, 1999) et par des facteurs de croissance (Laughner *et al.*, 2001).

Toxoplasma induit une augmentation rapide (dès la deuxième heure suivant l'infection) de HIF α et active l'expression du gène *HIF1*. De plus, les cellules voisines non infectées, expriment également des niveaux élevés de HIF1. La prolifération et la survie du parasite sont sévèrement réduites dans les cellules knockdown pour HIF α cultivées sous 3% d'oxygène. Ceci démontre que, même si HIF1 n'est pas requis pour l'invasion, il l'est par contre pour la survie et la multiplication parasitaire dans des conditions physiologiques d'oxygénation que l'on retrouve dans le cerveau, les muscles ou la rétine, sites privilégiés de persistance du parasite (Spear *et al.*, 2006).

Deux mécanismes distincts peuvent être impliqués dans l'activation du facteur de transcription HIF1. Dans le premier, HIF1 serait activé en raison des conditions d'hypoxie

locale dues à la consommation en oxygène du parasite lui-même. Dans le deuxième modèle, des facteurs diffusibles signaleraient à la cellule-hôte d'activer HIF1. Des ROS (Reactive oxygen species) comme l'oxyde nitrique et les superoxydes seraient des candidats puisqu'induits par l'infection et parce qu'ils sont capables d'activer HIF1.

HIF pourrait promouvoir la croissance parasitaire en modulant l'expression des gènes qu'il régule. Parmi ceux-ci, quatre groupes de gènes sont à distinguer : ceux impliqués dans la prolifération cellulaire, la survie cellulaire, le métabolisme du fer et le métabolisme du glucose qui semblent les plus susceptibles d'intervenir dans la croissance parasitaire.

HIF1 représente une cible thérapeutique attractive car il régule des gènes qui seraient importants pour la croissance parasitaire et qu'il est activé seulement quand les cellules sont exposées à des conditions environnementales spécifiques. Une drogue ciblant HIF1 ciblerait donc les cellules infectées. Enfin, les tumeurs existent dans des conditions d'hypoxie et plusieurs inhibiteurs de HIF ont été découverts. C'est le cas du Topotecan (inhibiteur de la topoisomérase) et YC-1 (activateur de la guanylyl cyclase) (Raspisarda *et al.*, 2002, Yeo *et al.*, 2003).

Il est intéressant de constater que *Trypanosoma cruzi* consomme aussi de l'oxygène mais n'active pas HIF1 (Vaena De Avalos *et al.*, 2002).

V.4. EGR2

A côté de HIF1, d'autres gènes impliqués dans la croissance cellulaire et la survie sont up-régulés lors de l'infection. Parmi ces gènes se trouvent ceux codant pour des sous-unités des facteurs de transcription EGR1 et 2 (early growth response) et AP-1 (Blader *et al.*, 2001). De plus, ils ont un rôle bien connu dans la réponse au stress.

EGR2 est activé rapidement dans les cellules infectées. Cette activation est corrélée avec la sécrétion des rhoptries (Phelps *et al.*, 2008) mais ROP16 ne serait pas le facteur induisant l'activation de EGR2 puisque celui-ci est activé quel que soit l'allèle de ROP16 exprimé par la souche de *T. gondii* (Saeij *et al.*, 2007). De plus EGR2 est régulé par les trois souches de parasite, suggérant que, contrairement à ROP16 et ROP18, le facteur activant EGR2 n'est pas polymorphique. Le rôle de EGR2 durant l'infection reste encore à élucider mais les gènes régulés par EGR2 comprennent des gènes qui pourraient pallier aux besoins nutritionnels du parasite (métabolisme du cholestérol et du fer). De plus EGR2 est impliqué dans les

phénomènes de survie cellulaire car il régule certains facteurs anti-apoptotiques de la famille Bcl2 mais également, dans certaines situations, des facteurs pro-apoptotiques comme p53 ou BAK. C'est pourquoi, EGR2 pourrait promouvoir la croissance du parasite mais également protéger les cellules-hôtes de l'infection (Phelps *et al.*, 2008).

VI. Manipulation du système immunitaire de la cellule-hôte

Toxoplasma était autrefois considéré comme un pathogène purement pro-inflammatoire. Nous avons maintenant une vision plus nuancée de l'interaction de ce pathogène avec son hôte. Une caractéristique de l'infection par *T. gondii* est qu'elle induit une régulation fine (activation/inhibition) de la réponse immunitaire, ceci pour assurer la survie de la cellule-hôte et la prolifération parasitaire. Du point de vue parasitaire, il est bénéfique d'être détecté par le système immunitaire de l'hôte. Si tel n'était pas le cas, le parasite induirait des infections létales pour l'hôte et de ce fait minimiserait la probabilité de transmission entre hôtes. La capacité de *T. gondii* à établir une infection asymptomatique, chronique chez 1 milliard de personnes ou plus, est la conséquence d'une régulation fine du système immunitaire de l'hôte. Chez les sujets immunocompétents, l'infection par *T. gondii* est contrôlée par une forte réponse immunitaire protectrice pour l'hôte (Denkers et Gazzinelli, 1998). Ceci réside largement dans la capacité du parasite à induire la production d'IL-12 par les cellules du système immunitaire inné (Sher *et al.*, 2003). L'IL-12 produite stimule l'activité des cellules T et leur différenciation en T helper de type 1 capables de sécréter l'IFN- γ (Aliberti *et al.*, 2004). Ces cytokines activent également les cellules Natural Killer (NK) pour sécréter l'IFN- γ (Korbel *et al.*, 2004). L'IFN- γ déclenche l'activité microbicide de nombreuses cellules (macrophages, cellules dendritiques) par l'induction d'enzymes qui sont STAT1 dépendantes ; c'est le cas de l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS), la GTPase interféron inductible (IGTP) et l'indolamine dioxygénase (IDO).

Ces réponses sont en partie déclenchées grâce à l'activité de ligands des TLR exprimés par le parasite. Par exemple, un glycosylphosphatidylinositol porté par les tachyzoïtes active TLR2 et 4 (Debierre-Grockiego *et al.*, 2007). La profiline de *T. gondii* induit une production importante d'IL-12 par l'intermédiaire de l'activation de TLR11 chez la souris (Yarovinsky *et al.*, 2005).

Durant l'infection *in vivo*, le parasite doit induire une réponse immune protectrice pour permettre sa survie, la survie de l'hôte et l'établissement d'une infection latente (Denkers and Gazzinelli 1998, Pepper and Hunter 2007). En même temps, le parasite doit éviter d'induire une réponse pro-inflammatoire trop forte qui pourrait aboutir à forte activité antimicrobienne et dans certains cas, à une immunopathologie létale pour l'hôte (Gazzinelli *et al.*, 1996, Suzuki *et al.*, 2000). A cet égard, *T. gondii* doit échapper à la réponse immunitaire en prévenant la production importante de cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α , IL-12 et IFN- γ . La létalité des souches virulentes de type I a été associée à la surproduction de cytokines pro-inflammatoires (Mordue *et al.*, 2001) et les souris déficientes pour IL-10 succombent à l'infection, ceci étant dû à une surproduction de cytokines pro-inflammatoires (Gazzinelli *et al.*, 1996). Il est donc important pour le parasite d'avoir une régulation appropriée de l'IFN- γ et des autres cytokines pro-inflammatoires pour maintenir une balance appropriée entre protection et immunopathologie.

Le parasite n'active pas seulement la production de cytokines pro-inflammatoires, il active également des voies de signalisation conduisant à la libération de médiateurs anti-inflammatoires comme IL-10, TGF- β et la lipoxin A₄ (Aliberti *et al.*, 2005). La fonction majeure de ces médiateurs durant l'infection est de freiner la réponse pro-inflammatoire et donc d'éviter les effets immunopathologiques dus à la surproduction potentiellement létale de cette réponse. Une telle réponse est essentiellement déclenchée par l'hôte, mais elle pourrait être aussi médiée par le parasite pour garder la cellule-hôte en vie pendant la durée de l'infection.

VII. *T. gondii* cible la modification des histones pour inactiver certains gènes

Toxoplasma prend une part active dans la régulation de la réponse inflammatoire en interférant avec les voies de signalisation conduisant à la production de médiateurs pro-inflammatoires comme IL-12, TNF- α et NO. Le mécanisme moléculaire par lequel cela se produit n'est pas bien identifié, même si une perturbation de l'activation des MAPK, de la translocation de NF- κ B et de l'activation de STAT3 ont été incriminées.

L'expression génique inductible implique deux types de cascades de régulation : la première conduit à l'activation de facteurs de transcription, impliquant le plus souvent des kinases, pour

permettre leur liaison aux séquences promotrices des gènes cibles, dans le même temps, on sait maintenant que la structure de la chromatine elle-même est régulée, dans la mesure où la modification covalente des histones joue un rôle dans l'activité des facteurs de transcription. La transcription des gènes est initiée par des changements dans la structure de la chromatine entourant le promoteur. En général, la région promotrice, stimulée, induit le remodelage de la chromatine pour permettre un accès aux facteurs de transcription et à la ARN polymérase II. Le remodelage de la chromatine comprend habituellement la phosphorylation, l'acétylation et la méthylation des histones accompagnées d'un désassemblage du nucléosome. Parmi les modifications des histones, la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10, l'acétylation de l'histone H3 sur les lysines 9 et 14 sont associées à l'activation des gènes.

Toxoplasma gondii supprime la production de TNF- α dans les macrophages, ce qui est associé à une diminution du recrutement de l'ARN polymérase II au promoteur (Leng *et al.*, 2009). Dans le cas de l'IL-12, les auteurs ont observé une inhibition de cette cytokine après 12 heures d'infection des macrophages, alors que l'expression de TNF- α reste bloquée pendant toute la durée de l'infection. Durant la stimulation par le LPS, l'infection par *Toxoplasma* est capable de bloquer l'accumulation du facteur de transcription c-Jun mais pas de NF- κ B ni de CREB (AMPC-responsive element-binding protein). Toutefois, NF- κ B ainsi que CREB sont incapables de se lier au promoteur du gène TNF- α . Ceci s'explique par la capacité du parasite à empêcher le remodelage de la chromatine entourant le promoteur de TNF- α en inhibant la phosphorylation Ser10 et l'acétylation Lys9/14 de l'histone H3 au niveau du promoteur du TNF- α . La phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 permet le recrutement de plusieurs Histones Acétyl Transférases (HAT) pour catalyser l'acétylation des Lysines 9 et 14, c'est pourquoi, il est possible que les effets du parasite sur l'acétylation de l'histone H3 au promoteur du TNF- α soit indirectement médiés par l'inhibition de la phosphorylation de la sérine 10. La structure de la chromatine entourant le promoteur du TNF- α reste dans un état fermé dans les cellules infectées, et les facteurs de transcription ne peuvent donc pas accéder à leurs sites de liaison. L'ARN polymérase II n'est pas recrutée au promoteur du TNF- α et la transcription n'est donc pas initiée (Leng *et al.*, 2009). Il est intéressant de noter que ce phénomène est spécifique au gène TNF- α car le niveau global d'acétylation de l'histone H3 n'est pas diminué dans les macrophages.

Toxoplasma module négativement plusieurs gènes TLR4-inductibles mais pas IL-10. L'activation *via* le LPS des macrophages induit de faibles quantités d'IL-10 et ce sans

modifications significatives de l'histone H3. Par contre, l'induction massive d'IL-10 est associée à la phosphorylation sur la sérine 10 et à l'acétylation des lysines 9 et 14 sur l'histone H3 du promoteur de l'IL-10. L'induction d'IL-10 massive dans les macrophages requiert deux voies de signalisation : la première émane de TLR4 et résulte en l'activation de facteurs de transcription comme STAT3 et Sp1, la seconde est activée *via* FcγR et résulte en un remodelage de la chromatine dans le promoteur du gène IL-10 pour permettre l'accès à des facteurs de transcription. Leng *et al.*, (2009) suggèrent que *Toxoplasma* inhibe l'induction massive d'IL-10 en interférant sur la voie impliquant le remodelage de la chromatine (Leng *et al.*, 2009). Les faibles niveaux d'induction d'IL-10 médié par les TLR4 ne sont pas affectés par l'infection. Par contre l'induction massive d'IL-10 induite par TLR4 et FcγR est bloquée par *T. gondii*. IL-10 est un médiateur anti-inflammatoire qui est important pour moduler à la baisse une réponse pro-inflammatoire et éviter toute pathologie immune. Les souris déficientes en IL-10 succombent durant la phase aiguë de l'infection par *T. gondii*. La mort est associée à un emballement de la réponse proinflammatoire qui bien que contrôlant l'infection induit une pathologie immune létale (Gazzinelli *et al.*, 1996, Suzuki *et al.*, 2000). De la même façon, l'IL-10 joue un rôle important en limitant l'inflammation durant les encéphalites toxoplasmiques (Wilson *et al.*, 2005). Du point de vue parasitaire, la production d'IL-10 est importante pour maintenir la cellule-hôte en vie et augmenter les chances de transmission. Néanmoins, la capacité de l'IL-10 à moduler à la baisse l'activation de cellules effectrices de la réponse immunitaire innée comme les macrophages suggère que la surproduction de cette cytokine doit être évitée. Dans ce cas, la multiplication incontrôlée du parasite induirait rapidement la mort de l'hôte minimisant de ce fait les chances de transmission à un nouvel hôte. L'inhibition des hauts et non des faibles niveaux d'IL-10 est une capacité du parasite à maintenir des niveaux d'IL-10 appropriés afin d'éviter toute pathologie immune et permettre la formation de kystes favorisant la persistance à long terme du parasite.

Toxoplasma inhibe la capacité des macrophages et des fibroblastes à répondre à l'IFN-γ. Dans le cas des fibroblastes, une large gamme de gènes activés par l'IFN-γ sont inhibés durant l'infection (Kim *et al.*, 2007). Compte tenu de ces résultats, il est tentant de penser que cibler la modification de la chromatine dans la cellule-hôte fournit une explication quant à la capacité du parasite à simultanément réguler à la baisse un large panel de gènes pro-inflammatoires. Plutôt que de cibler les facteurs de transcription spécifiques (ce qui semble être un moyen relativement inefficace d'inhiber l'expression de plusieurs gènes en même

temps), le parasite pourrait obtenir le même effet en bloquant les modifications inductible de l'histone H3 et éventuellement d'autres histones (Figure 24).

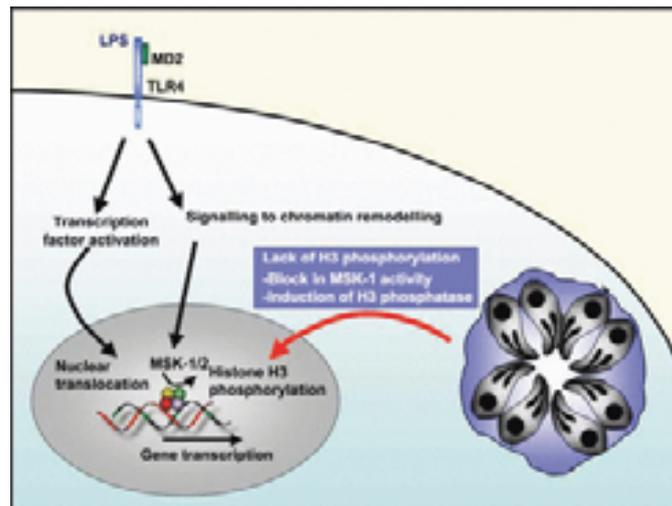


Figure 24 : *T. gondii* cible la voie de remodelage de la chromatine. L'activation des macrophages par le biais de récepteurs tels que TLR4 induit la production de cytokines pro-inflammatoires multiples. L'activation de facteurs de transcription et leur liaison aux promoteurs des gènes-cibles sont requis pour activer ces gènes spécifiques. Toutefois, avant la liaison, le signal induisant la modification des histones est nécessaire dans de nombreux cas pour remodeler la chromatine en une configuration ouverte qui permet aux facteurs de transcription d'agir au niveau des régions cibles du promoteur. *T. gondii* cible la voie de remodelage de la chromatine, offrant une explication à la capacité du parasite à réguler en même temps à la baisse un large panel de cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines. On remarque en particulier une inhibition de phosphorylation de l'histone H3 (Leng *et al.*, 2009)

On ne sait pas encore comment *Toxoplasma* influence la modification des histones mais on sait que le noyau de la cellule-hôte est une cible pour des protéines effectrices parasitaires. La kinase ROP16 ou de la phosphatase PPC2 sont retrouvées dans le noyau de la cellule-hôte où pourraient participer directement ou indirectement aux modifications des histones observées. Elles pourraient par exemple interférer avec les kinases et les acétylases des histones de l'hôte. Il est également possible que d'autres kinases ou phosphatases parasitaires puissent être délivrées dans le noyau et interférer avec la transcription des gènes de la cellule-hôte en ciblant le remodelage de la chromatine.

Alors que *Toxoplasma* est le seul protozoaire intracellulaire identifié à ce jour comme étant capable de modifier la chromatine des cellules-hôtes, il est possible que d'autres protozoaires

parasites possèdent des propriétés similaires. À cet égard, un nombre croissant d'agents pathogènes bactériens ont été récemment signalés comme interférant avec le remodelage de chromatine de l'hôte (Hamon *et al.*, 2008).

Listeria monocytogenes, une bactérie pathogène, induit une déphosphorylation de l'histone H3 sur la Ser10 et la désacétylation de l'histone H4 lors d'une infection précoce (Hamon *et al.*, 2007). Le facteur de virulence de *Listeria*, la listériolysine O, a été identifiée comme la protéine majeure requise pour la déphosphorylation de l'histone H3 et la désacétylation de l'histone H4.

VIII. Impact du génotype et des protéines de rhoptries de *Toxoplasma gondii* sur les interactions hôte-parasite

Les différentes souches de *Toxoplasma* différencieraient profondément dans la façon dont elles moduleraient les voies de signalisation intracellulaires (Saeij *et al.*, 2007). Comprendre les facteurs influençant la virulence et les mécanismes de sélection en fonction des espèces pourrait contribuer au développement de nouvelles thérapeutiques.

VIII.1. Modulation des facteurs de transcription STAT3 et NF- κ B en fonction de la souche parasitaire

VIII.1.1. STAT3

L'infection par *T. gondii* régule la réponse immunitaire et notamment les cytokines pro-inflammatoires de manière dépendante de STAT3. Ceci par l'intermédiaire de ROP16 et de sa fonction kinase. Yamamoto *et al* (2009) ont montré que la substitution d'un seul acide aminé dans le domaine kinase de ROP16 entre les souches de type I et II détermine la différence d'activation de STAT3 en fonction des souches. En effet, l'activation de STAT3 observée avec les souches de type I est déficiente dans le cas d'une infection avec une souche de type II (Butcher *et al.*, 2005). Très tôt après l'infection, les cellules infectées par les souches de type I, II ou III présentent une localisation nucléaire de STAT3 phosphorylé. Mais pour des temps plus tardifs, les cellules infectées par une souche de type I ou III présentent une quantité plus importante de STAT3 et STAT6 que des cellules infectées par une souche de type II (Saeij *et*

al., 2007). ROP16 est hautement polymorphique entre les souches de type I ou III et les souches de type II (Saeij *et al.*, 2006 et 2007). Partant du principe que l'expression de ROP16 dans les trois souches est sensiblement la même, le polymorphisme de ROP16 pourrait être la cause de l'activation défective de STAT3 dans les souches de type II. La substitution d'une leucine par une sérine en position 503 du domaine kinase de ROP16 induit une diminution significative de l'activation de STAT3. De plus, la leucine en position 503 serait requise pour soutenir la phosphorylation de STAT3 durant l'infection puisque cette phosphorylation décroît plus rapidement dans les cellules infectées avec une souche présentant l'allèle ROP16-II. La substitution observée pour les souches de type II pourrait déformer le site actif de ROP16 et donc diminuer la capacité des substrats à s'y lier (Yamamoto *et al.*, 2009).

VIII.1.2. NF- κ B

Pour certains auteurs, les différences décrites dans l'activation ou non de NF- κ B seraient dues à l'utilisation de lignées cellulaires différentes plutôt qu'à des différences de souches. Mais d'autres travaux ont montré des différences nettes dans la faculté de transloquer NF- κ B dans le noyau des cellules infectées par *T. gondii* en fonction du type de souche. Plusieurs études effectuées par micro-arrays ont démontré que les cellules infectées avec des souches de type II présentent des niveaux plus élevés de régulation des gènes de NF- κ B comparés aux cellules non infectées (Blader *et al.*, 2001). La souche de type II ME49 et non la souche de type I RH induit une translocation de NF- κ B dans le noyau de splénocytes murins (Dobbin *et al.*, 2002). Ces effets seraient dépendants de la protéine HSP70 (heat shock protein 70) parasitaire. Lorsque des cellules-hôtes sont infectées par des tachyzoïtes virulents traités afin de réduire l'expression d'HSP70, ils deviennent incapables d'inhiber la translocation de NF- κ B du cytoplasme vers le noyau. Les mécanismes par lesquels HSP70 pourrait interférer avec l'activation de NF- κ B ne sont pas encore élucidés. HSP70 semble jouer un rôle dans la capacité des parasites à moduler la réponse immunitaire de l'hôte et serait un moyen par lequel les souches virulentes de *Toxoplasma* échappent aux réponses pro-inflammatoires. Pour les souches avirulentes, HSP70 pourrait être impliqués dans la conversion tachyzoïte-bradyzoïte.

Robben *et al.*, (2004) ont également montré que dans les macrophages murins infectés par une souche de type II, l'activation de NF- κ B avait lieu plus efficacement par rapport à une infection avec une souche de type I, ceci ayant pour conséquence une production d'IL-12 plus

importante. Le fait que les souches de type I échouent dans l'induction de production d'IL-12 leur permettraient de se multiplier de façon incontrôlée et donc d'augmenter la virulence de ces infections. A l'opposé, l'activation rapide de la production d'IL-12 par les souches de type II conduirait à un meilleur contrôle de la réplication parasitaire.

VIII.2. Implication de ROP16 et ROP18 dans la modulation des voies de signalisation de la cellule-hôte et la virulence

ROP18 dicte la croissance parasitaire et la virulence

Différentes études ont identifié, sur le chromosome VIIa, un locus associé à la virulence (Saeij *et al.*, 2006, Taylor *et al.*, 2006). Bien que ce locus contienne de nombreux gènes, un en particulier a retenu l'attention : celui codant pour ROP18 qui possède un domaine kinase et de nombreux SNP (single-nucléotide polymorphisme). De plus, l'expression de ROP18 diverge extrêmement entre les souches de type I et III, avec une ROP18-III presque indétectable en comparaison de ROP18-I et II. L'analyse du promoteur de ROP18 a révélé la présence d'une séquence supplémentaire de 2.1 kb, proche du codon d'initiation pour les souches de type III, région qui est absente des souches de type I et II (Saeij *et al.*, 2006). Cette séquence est probablement responsable de la diminution d'expression de ROP18-III. Par le passé, les auteurs considéraient que le taux de réplication du parasite influençait la virulence mais aucune preuve directe n'avait été trouvée. Depuis, Taylor *et al.*, (2006) ont observé que l'expression de ROP18-I dans une souche de type III induit une augmentation significative de la réplication et que l'expression de ROP18 est directement corrélée à la prolifération parasitaire et à la virulence. La surexpression de ROP18 dans une souche de type I augmente la réplication intracellulaire du parasite (El Hajj *et al.*, 2007). De plus, les souris infectées avec une souche de type III exprimant ROP18-I ou II succombent à une infection létale contrairement à celles infectées avec une souche de type III normale (Taylor *et al.*, 2006). Cependant, ROP18 n'est pas le seul gène impliqué et d'autres gènes influenceraient également la virulence.

ROP18 possède un domaine kinase actif, essentiel pour assurer une croissance parasitaire rapide et l'induction de la virulence chez la souris (El Hajj *et al.*, 2007). Elle est exprimée à la surface de la MVP et est directement exposée au cytosol de la cellule-hôte ce qui en fait un

excellent candidat impliqué dans les modifications des voies de signalisation cellule-hôte qui ont été observées. Cependant, les essais *in vitro* n'ont pas mis en évidence de protéines-hôtes phosphorylées par ROP18. En relation avec un rôle indirect dans la modulation des voies de signalisation de la cellule-hôte, ROP18 phosphoryle une protéine parasitaire inconnue de 70 kDa (El Hajj *et al.*, 2007). La recherche de substrats de ROP18, leur implication dans des voies de signalisation et les changements qu'ils peuvent entraîner dans l'expression des gènes de la cellule-hôte devrait permettre d'expliquer comment ROP18 oriente la croissance parasitaire et la virulence.

ROP16 module les voies de signalisation de la cellule-hôte

En étudiant d'autres distinctions entre les différentes souches parasitaires, Saeij *et al.*, (2007) ont observé des différences souches-dépendantes dans l'expression des gènes de la cellule-hôte durant l'infection *in vitro*. Le chromosome VIIb contiendrait les gènes impliqués dans les différences observées et plus spécifiquement, un locus de ce chromosome modulerait les gènes impliqués dans les voies de signalisation des JAK/STAT, de l'IL-4 et de l'IL-6. Les principaux facteurs de transcription orchestrant ces voies de signalisation sont STAT3, STAT5b, JUN et HIF1 α . STAT3 et 6 sont phosphorylés lors de l'infection et bien que la phosphorylation de STAT3 soit observée rapidement après l'infection pour toutes les souches, seules les souches de type I et III maintiennent cette phosphorylation 18 heures après l'infection. ROP16 est impliquée dans la phosphorylation de STAT3 mais pourrait également participer à la modulation d'autres voies de signalisation de la cellule-hôte et jouer un rôle important dans la régulation des gènes de la cellule-hôte infectée.

IX. Le noyau : nouvelle destination pour des protéines effectrices parasitaires

ROP16 est retrouvée en abondance dans le noyau de la cellule-hôte infectée. Une autre protéine de rhoptrie a récemment été retrouvée dans le noyau de la cellule-hôte ; elle présente des homologies de séquence avec les protéines PP2C (protein phosphatase 2C). PP2C relarguée par les rhoptries lors de l'invasion présente une activité phosphatase mais moindre par rapport aux autres protéines de la famille. Sa localisation nucléaire pourrait signifier que son substrat se trouve dans le noyau, mais cette protéine pourrait également avoir une cible située dans les rhoptries (Gilbert *et al.*, 2007). Il est intéressant de noter qu'une PP2C

al., 2006). GRA10 possède un signal de localisation nucléaire et est retrouvé dans le noyau des cellules HeLa infectées (Ahn *et al.*, 2007). D'autres expériences seront nécessaires pour identifier clairement l'impact de GRA10 sur les voies de signalisation de la cellule-hôte.

Conclusion

Dès son contact avec la cellule-hôte et à l'intérieur de la vacuole parasitophore, le parasite réorganise les organelles de la cellule-hôte, du cytosquelette, module des facteurs de transcription et prévient l'apoptose des cellules infectées. L'identification des voies de signalisation modulées par le parasite et des facteurs parasitaires induisant cette modulation est vitale pour permettre la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques anti-Toxoplasmiques.

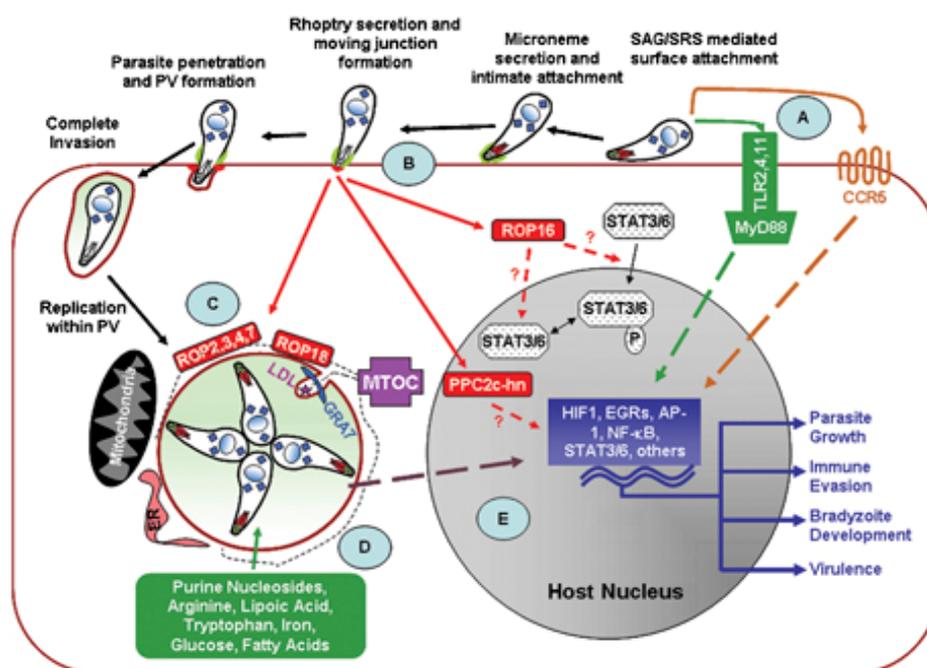


Figure 25 : Interactions hôte-parasite. (A). Les réponses immunitaires innées sont initiées par les TLR. (B). L'invasion parasitaire est médiée par la libération des adhésines de micronèmes qui interagissent avec des facteurs de surface de l'hôte. Il s'en suit la sécrétion des protéines de rhoptries qui aboutit à la formation de la jonction mobile et à la libération de facteurs parasitaires (par exemple les membres de la famille ROP2, ROP16, ROP18, et PP2C-HN) qui vont soit interagir avec la vacuole parasitophore (PV) (famille ROP2 et ROP18) soit être transportés vers le cytoplasme-hôte (ROP16) ou le noyau (PP2C, ROP16). Certains de ces facteurs (ROP16 et ROP18) sont des facteurs de virulence polymorphes. (C). Les parasites intracellulaires réorganisent les mitochondries et le réticulum endoplasmique de l'hôte ainsi que le MTOC et le cytosquelette, autour de la PV. Les microtubules de l'hôte associés aux LDL-chargés en cholestérol forment des tubules membranaires qui s'invaginent

dans la PV et sont stabilisés par GRA7. (D). Les petits éléments nutritifs solubles diffusent librement à travers la PV et sont ensuite captés par le parasite sans doute par des transporteurs membranaires. (E) Les changements dans l'expression des gènes de la cellule-hôte peuvent soit favoriser la croissance du parasite, l'évasion immunitaire, la virulence, ou le développement en bradyzoïtes (Blader *et al.*, 2009).

C - Le facteur de transcription UHRF1

UHRF1 (Ubiquitin-like containing PHD and Ring Finger domains, 1) est une protéine nucléaire membre d'une nouvelle famille de protéines associée à la régulation de la prolifération cellulaire et aux modifications épigénétiques. Elle a été découverte comme facteur de transcription impliqué dans la régulation transcriptionnelle du gène de la *Topoisomérase II α* (TopoII α) (Hopfner *et al.*, 2000). Les DNA topoisomérases eucaryotes sont des enzymes nucléaires qui altèrent la topologie de l'ADN en générant des coupures transitoires dans le brin d'ADN. Deux types de topoisomérases II α et β ont été identifiées. La Topo II α est la cible de nombreuses drogues anticancéreuses comme l'étoposide. Son expression est régulée en fonction du cycle cellulaire. Peu de facteurs contrôlant l'activité de la Topo II α sont connus et ils ne peuvent expliquer les variations d'expression de celle-ci ; de plus, la connaissance de ces facteurs semble importante dans le contexte de résistances aux drogues actuelles (Kaufmann, 1997). Dans cette optique, des études menées en simple hybride ont permis l'identification d'une nouvelle protéine de 793 acides aminés avec un poids moléculaire théorique de 89.758 kDa et appelée ICBP90 (Inverted CCAAT box Binding Protein of 90 kDa). Sa récente nomenclature internationale est UHRF1 (Hopfner *et al.*, 2000) et Np95, une protéine nucléaire de 95 kDa de la souris, est considérée comme l'équivalent d'UHRF1 chez la souris.

I. Caractéristiques structurales d'UHRF1

I.1. La protéine UHRF1

La protéine UHRF1 est constituée de 793 acides aminés. Elle présente plusieurs domaines d'intérêt ; de l'extrémité NH₂ vers COOH terminale, on observe la présence, d'un domaine ubiquitin-like connu pour son implication dans la dégradation sélective de protéines par la voie du protéasome. Un domaine TTD (tandem Tudor domain) qui est impliqué dans la

liaison à l'histone H3 (Rottach *et al.*, 2009). Ensuite, un « PHD (Plant Homeo Domain) finger » qui pourrait jouer un rôle dans la liaison à l'ADN. Puis, un domaine G9a/SRA (Set and Ring associated domain) qui est impliqué dans le recrutement des HDAC (Histones desacétylases) et dans la liaison aux séquences d'ADN méthylées, deux séquences de localisation nucléaire (SLN) et finalement un domaine RING (Really Interesting New Gene) finger possédant une activité ubiquitine ligase de type E3 (Figure 26).

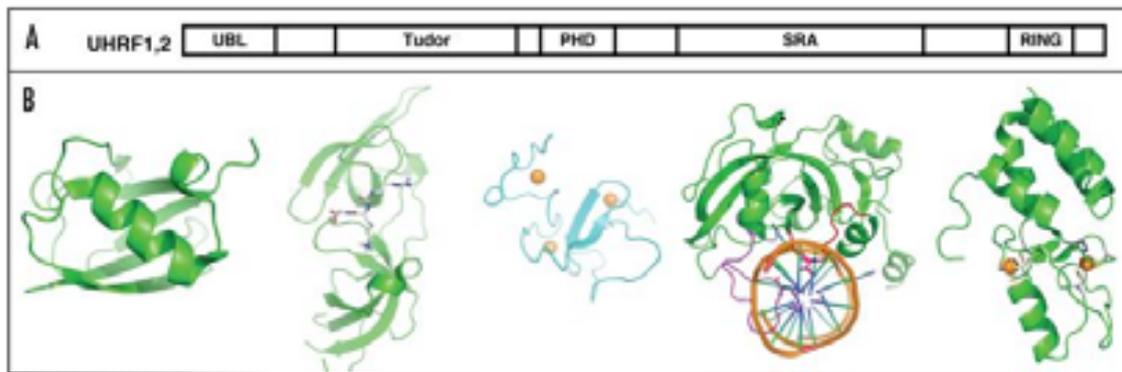


Figure 26 : Structure de la protéine UHRF1. (A) Représentation schématique d'UHRF1. (B) Structures connues de 5 domaines de la protéine (Hashimoto *et al.*, 2009).

UHRF1 possède également de nombreux sites de phosphorylation qui pourraient jouer un rôle capital dans la modulation de son activité biologique.

I.2. Le gène *uhrf1*

Le gène *uhrf1* est localisé sur le chromosome 19p13.3 et couvre une portion d'ADN génomique d'au moins 35,8 kb. Il possède 2 exons non-codants (I et II) et 6 codants (A à F). Une région d'épissage est présente dans l'exon A (Hopfner *et al.*, 2001) (Figure 27).

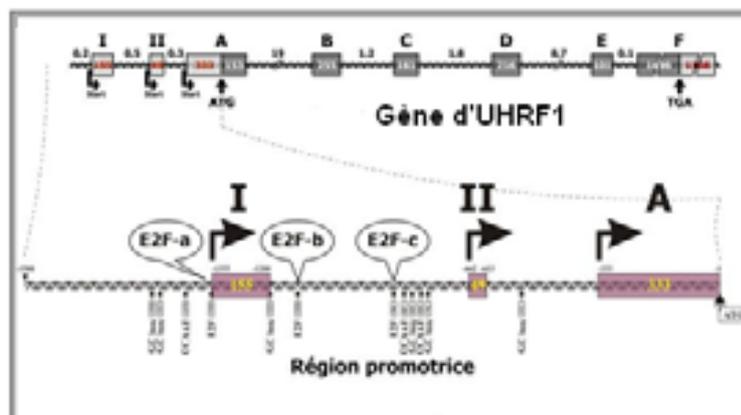


Figure 27 : Le gène d'*uhrf1*. Les exons sont représentés par des boîtes: les boîtes noires indiquent les exons codant, les boîtes grises indiquent les exons non-codants. Les lignes entre les boîtes symbolisent les introns. ATG est le site d'initiation, TGA est le site de terminaison. Dans la région promotrice du

gène d'*uhrfl* trois sites d'initiation de la transcription sont indiqués par des flèches. Les positions des boîtes GC, des boîtes " CCAAT " ainsi que les trois sites potentiels de liaison au facteur E2F sont indiquées (d'après Hopfner *et al.*, 2001).

Le promoteur du gène *uhrfl* ne renferme pas de boîtes TATA mais plusieurs boîtes GC et trois boîtes CCAAT qui pourraient être la cible de « CCAAT-binding proteins » et d'UHRF1 elle-même pour autoréguler son expression. Le promoteur d'*uhrfl* renferme trois sites de liaison au facteur E2F.

II. Expression d'UHRF1

UHRF1 endogène ou sur-exprimée est localisée exclusivement dans le noyau des cellules, ce qui est cohérent avec la présence de deux sites de localisation nucléaire dans sa séquence d'acides aminés. Dans les cellules en prolifération, UHRF1 est exprimée à un niveau plus élevé que dans les cellules à confluence. Elle est dérégulée dans les cellules cancéreuses où elle est exprimée en permanence et à un taux plus élevé que dans les cellules normales (Hopfner *et al.*, 2000).

UHRF1 voit son expression varier au cours du cycle cellulaire avec un pic en fin de phase G1 et au cours de la phase G2/M (Mousli *et al.* , 2003) (Figure 28). Dans les cellules cancéreuses UHRF1 est exprimée de manière constante, même lorsque les cellules sont confluentes ou quiescentes.

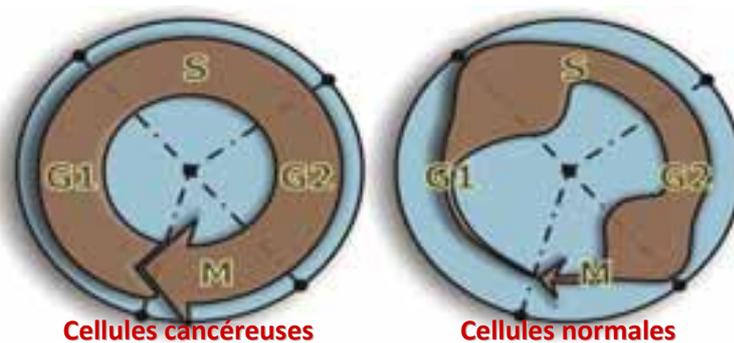


Figure 28 : Expression d'UHRF1 au cours du cycle cellulaire

De plus, l'ARNm d'UHRF1 est fortement exprimé dans le foie fœtal, les poumons et le cœur qui sont des tissus peu différenciés ou en prolifération, alors qu'il n'est pas exprimé dans les tissus bien différenciés comme le système nerveux central (Hopfner *et al.*, 2000).

L'expression d'UHRF1 est régulée par E2F-1, facteur de transcription qui joue un rôle clé dans la progression du cycle cellulaire (Mousli *et al.*, 2003) ainsi que par phosphorylation par différentes kinases (Bronner *et al.*, 2004, Trotizer *et al.*, 2004) et notamment par les protéines kinases PKA (protéine kinase A) et CK2 (casein kinase 2) qui phosphorylent des facteurs de transcription contrôlant, par ce biais leur activité de liaison à l'ADN. ERK1 (Extracellular signal-regulated kinases) pourrait également moduler l'activité d'UHRF1 (Fang *et al.*, 2009). Enfin, l'expression d'UHRF1 est également régulée par le complexe p53/p21^{WAF1} qui est activé lors de dommages à l'ADN. UHRF1 est régulé négativement à la fois, par une réduction de sa transcription mais également, par la promotion de sa dégradation par la voie du protéasome (Arima *et al.*, 2004). Ceci contribue à l'arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire. Ces résultats suggèrent qu'UHRF1 fonctionne comme un composant de la réponse aux dommages à l'ADN et donc joue un rôle dans le maintien de la stabilité génomique.

III. Fonctions du facteur de transcription UHRF1

III.1. UHRF1 et son rôle dans la régulation du cycle cellulaire

III.1.1. Généralités sur le cycle cellulaire

La cellule progresse dans le cycle cellulaire en franchissant les phases G1, S (synthèse de l'ADN) et G2, qui précède la phase M (mitose).

La régulation du cycle cellulaire nécessite l'action coordonnée des cyclines et de leurs partenaires les Cdks (cyclin-dépendant-kinase). Les cyclines ne sont pas présentes pendant tout le cycle, elles apparaissent puis disparaissent brusquement à des moments précis du cycle, de façon périodique. Les Cdk ne deviennent fonctionnelles que lorsqu'elles sont associées à une cycline et peuvent donc être sous forme activée ou désactivée, selon qu'elles sont associées ou non à leur cycline. Ce sont des sérine-thréonine kinases, enzymes qui catalysent la phosphorylation des protéines. Leur activité consiste à transférer le groupement γ -phosphate de l'ATP sur une sérine ou une thréonine, présentes dans les protéines cibles.

Le cycle cellulaire est contrôlé par au moins 6 complexes Cycline / Cdk différents qui interviennent à des moments précis du cycle cellulaire (Figure 29).

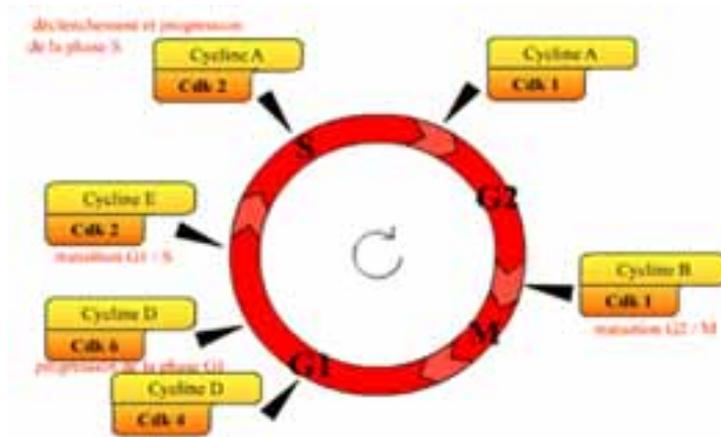


Figure 29 : Cycle cellulaire et complexes Cycline / Cdk. Au cours du cycle cellulaire, six complexes Cycline / Cdk interviennent (<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecellBM/index.htm>).

Les Cdks sont activées par phosphorylation sur la thréonine 161 par les kinases CAK (Cdk Activating Kinase) et par déphosphorylation sur la thréonine 14 et la tyrosine 15 par la famille des phosphatases Cdc 25. Les Cdk sont inhibées par des protéines inhibitrices, les CKI (Cdk Inhibitor) comme p16, p21, p27. La protéine p27 empêche la progression du cycle cellulaire en phase S en bloquant les complexes cycline E/A-Cdk2. Les Cdk sont également inhibées par une kinase, Wee 1 qui agit sur la Cdk1 en phosphorylant les sites tyrosine 15 et thréonine 14 (Figure 30).

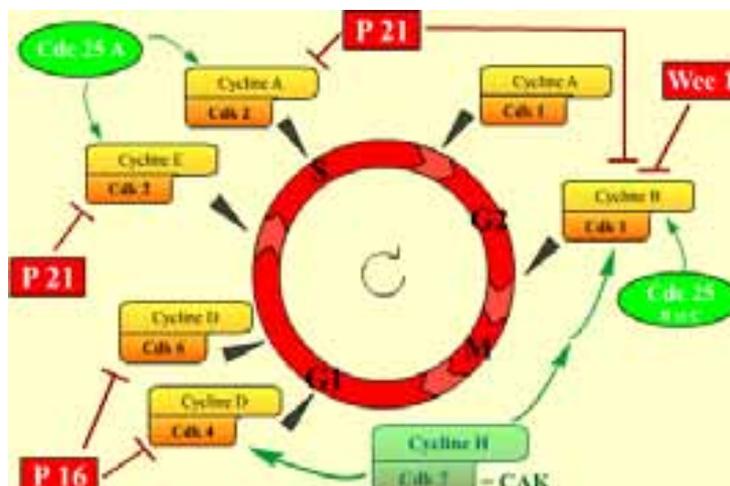


Figure 30 : Régulation de l'activité des Cdks
(<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecellBM/index.htm>).

III.1.2. Contrôle du cycle cellulaire par le facteur de transcription UHRF1

La répression d'UHRF1 dans les cellules bloque l'entrée des cellules en phase S (Arima *et al.*, 2004). De plus UHRF1 présente un pic d'expression maximal à la fin de la phase G1. Ces observations suggèrent un rôle possible d'UHRF1 au cours de la transition G1/S.

Plusieurs mécanismes sont envisagés pour expliquer l'implication d'UHRF1 dans la régulation du cycle cellulaire :

- par le contrôle de l'enzyme Topo II α

Le gène *Topo II α* est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, il peut jouer le rôle d'activateur ou de répresseur suivant les phases du cycle cellulaire, le type cellulaire et le statut de prolifération des cellules. UHRF1 est capable de réguler le gène de la *Topo II α* en se liant au CCAAT box du promoteur du gène *Topo II α* et en l'activant (Hopfner *et al.*, 2000) et participerait à l'induction du gène *Topo II α* lors de la transition G1/S (Mousli *et al.*, 2003). La surexpression d'UHRF1 dans les cellules induit une surexpression de la topoisomérase II α endogène. La phosphorylation est un processus essentiel de régulation de l'activité des protéines nucléaires. Trotzler *et al* (2004) ont mis en évidence plusieurs sites putatifs de phosphorylation par des kinases cAMP/cGMP-dépendantes dans la protéine UHRF1 et la protéine kinase A a été découverte comme phosphorylant un de ces sites (la sérine 298). La phosphorylation UHRF1 induit une augmentation de sa liaison au promoteur du gène *Topo II α* avec pour conséquence une augmentation d'expression de la protéine et un passage des cellules en phase G2/M.

- par l'interaction avec la voie pRB/E2F

Cette voie contrôle au moins 10% de tous les gènes exprimés pendant le cycle cellulaire. Les protéines codées par ces gènes sont celles de la réplication de l'ADN ainsi que celles des points de contrôle du cycle cellulaire (Harbour et Dean, 2000). La progression du cycle cellulaire repose sur l'activation d'un facteur de transcription, la protéine E2F. En se fixant sur

l'ADN, E2F active la plupart des gènes nécessaires à la phase S. L'activité d'E2F est étroitement régulée au cours du cycle cellulaire. La protéine est maintenue sous une forme inactive au cours de la phase G1. Lorsque la cellule approche de la transition G1/S, E2F devient actif et peut induire la transcription des gènes nécessaires à la réplication de l'ADN. (Figure 31). Parallèlement à l'activateur E2F, le cycle cellulaire est également contrôlé par la protéine RB. En début de la phase G1, RB n'est pas phosphorylée et une phosphorylation partielle a lieu au cours de cette phase. Sous ces deux formes, RB conserve ses propriétés inhibitrices et est toujours capable d'interagir avec E2F. La progression vers la phase S repose donc sur des phosphorylations séquentielles de RB, la réplication de l'ADN n'est permise que lorsque RB est complètement phosphorylé, c'est à dire lorsqu'il libère E2F.

Pour assurer la transition G1/S, les complexe cycline/Cdk phosphorylent pRB, ce qui entraîne le blocage de l'interaction pRB/E2F-1 et permet à E2F-1 d'activer l'expression des gènes codant pour des protéines essentielles à l'entrée en phase S. Par ailleurs, pendant les phases S et G2, l'inactivation de pRB par phosphorylation est maintenue.

L'interaction d'UHRF1 avec cette voie peut se produire à différents niveaux :

* La régulation du gène *uhrf1* par E2F

Trois sites potentiels de liaison du facteur de transcription E2F-1 ont été identifiés dans la région promotrice du gène *uhrf1*. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que E2F-1 se lie au promoteur du gène *uhrf1* (Unoki *et al.*, 2004). E2F-1 est connu pour réguler l'expression de la Topo II α mais le gène *Topo II α* ne contient pas de sites de liaison pour E2F-1 suggérant la présence d'un intermédiaire dans la régulation du gène *Topo II α* par E2F. UHRF1 pourrait correspondre à cet intermédiaire puisque son expression est corrélée à celle de la Topo II α lors d'une surexpression d'E2F dans les cellules (Mousli *et al.*, 2003).

* La régulation post-transcriptionnelle de pRB par UHRF1

La protéine UHRF1 possède un motif de liaison à pRB situé dans le domaine PHD finger. De plus, l'expression de UHRF1 et pRB est corrélée au cours du cycle cellulaire, à un niveau maximal d'expression à la fin de la phase G1 (Jeanblanc *et al.*, 2005). Ceci suggère une interaction de pRB avec UHRF1, interaction qui pourrait participer à la régulation de la transition G1/S. UHRF1 interagit avec la forme hypophosphorylée de pRB, forme sous laquelle il interagit également avec les facteurs de transcription comme E2F-1, de cette

manière, il peut inhiber son activité transcriptionnelle (Jeanblanc *et al.*, 2005). UHRF1 pourrait également être impliquée dans la dégradation de pRB par l'intermédiaire de la voie du protéasome puisqu'elle possède un domaine ubiquitin-like. Enfin, UHRF1 peut également cibler pRB au niveau transcriptionnel. La liaison de UHRF1 au promoteur du gène *RBI* se produit pendant la phase G1 et favorise l'entrée en phase S (Jeanblanc *et al.*, 2005).

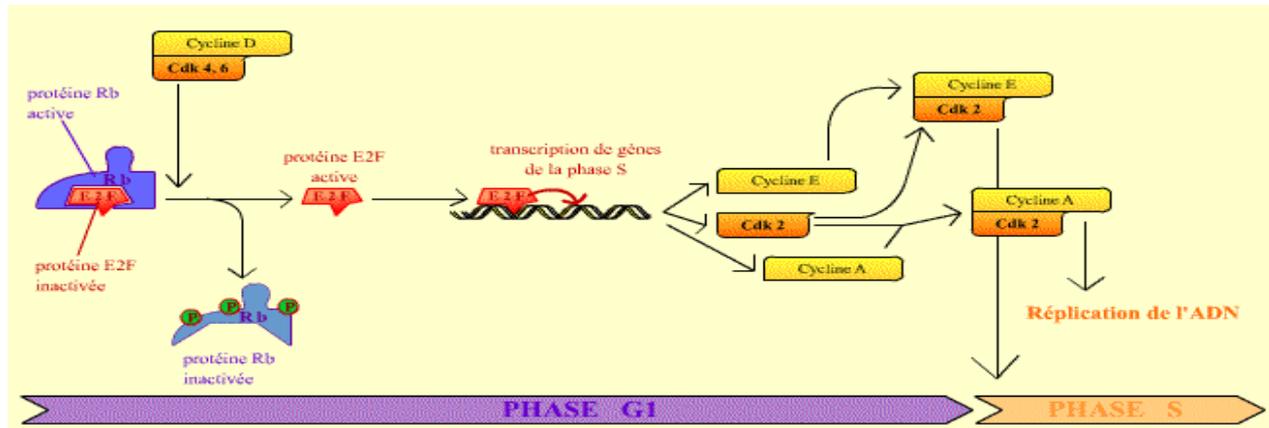


Figure 31 : La voie pRB/E2F : L'activation du facteur de transcription E2F, grâce à la phosphorylation de la protéine RB, permet la synthèse de gènes de la phase S. La transcription de Cdk 2 et de cycline E, en particulier, permet d'augmenter cette activation d'E2F, ce complexe phosphorylant RB. Ce mécanisme permet à la cellule de préparer son entrée en phase S (<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecellBM/index.htm>).

III.2. Implication d'UHRF1 dans différents cancers

III.2.1. Rôle d'UHRF1 dans le cancer

La prolifération incontrôlée des cellules est une marque de cancérogenèse et est souvent la conséquence d'événements comme l'absence de régulation à différents niveaux-clés du cycle cellulaire ou à des changements dans les voies de signalisation induisant la croissance cellulaire. L'identification de nouveaux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire pourrait conduire à l'identification de nouvelles drogues anticancéreuses.

UHRF1 est surexprimée dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses et dans certains tissus cancéreux comme ceux du sein (Hopfner *et al.*, 2000, Mousli *et al.*, 2003), de la prostate (Jenkins *et al.*, 2005), les adénocarcinomes pancréatiques (Crnogorac-Jurcevic *et al.*, 2005), les gliomes (Oba-Shinjo *et al.*, 2005). La dérégulation de l'expression de la protéine UHRF1 pourrait être un nouveau marqueur de malignité pour l'identification des cellules cancéreuses.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'implication d'UHRF1 dans la cancérogenèse (Figure 32).

➔ Dans 50% des cancers, l'expression et/ou les fonctions du gène suppresseur de tumeur *p53* sont abrogées (Hussain et Harris, 2000). Parce que *p53* régule à la baisse UHRF1 (par la désactivation du facteur E2F1 qui est un régulateur d'UHRF1), l'absence de *p53* dans les cellules cancéreuses peut être une cause de surexpression d'UHRF1 dans ces cellules (Arima *et al.*, 2004, Unoki *et al.*, 2004).

➔ Dans les cellules cancéreuses, les îlots CpG localisés dans les gènes suppresseurs de tumeur sont le plus souvent méthylés entraînant la régulation négative de ces gènes. UHRF1 cible les promoteurs méthylés de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs (Unoki *et al.*, 2004) comme *RBI*, *p16^{INK4A}* et *p14^{ARF}* et recrute HDAC1 à ces sites pour supprimer l'expression de ces gènes en désacétylant les histones (Unoki *et al.*, 2004, Bronner *et al.*, 2007). Ceci conduit à une perte de contrôle dans la transition G1/S et contribuerait au phénomène de cancérogenèse UHRF1 participerait également au maintien de la méthylation des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeur. Si cette méthylation était interrompue, différents gènes pourraient être activés, induisant une apoptose des cellules et un arrêt du cycle cellulaire.

➔ UHRF1, de par son activité E3 ubiquitine ligase, joue un rôle important dans la prolifération des cellules tumorales. L'utilisation d'inhibiteurs du protéasome comme le Velcade avec succès dans le traitement du myélome multiple, fait de la voie de dégradation des protéines une piste thérapeutique attractive. C'est pourquoi les E3 ligases représentent des cibles potentielles pour la thérapie anticancéreuse (Jenkins *et al.*, 2005).

➔CK2 est fortement exprimée dans les cancers. En conséquence, il est possible que la phosphorylation permanente d'UHRF1 et donc l'augmentation de son activité contribuerait à la prolifération continue des cellules cancéreuses (Bronner *et al.*, 2004).

➔Le gène *RBI* est un gène suppresseur de tumeur qui code pour la protéine pRB contrôlant le cycle cellulaire. *RBI* inhibe la progression du cycle cellulaire en phase G1/S en réprimant plusieurs gènes et ainsi supprime la tumorigenèse. Une perte de l'expression et de l'activité de pRB ont été observées dans plusieurs cancers. pRB coopère notamment avec une histone méthyltransférase dans le but de réprimer le promoteur de la cycline E. pRB est hypophosphorylée en phase G0/G1 et devient hyperphosphorylée en phase G1/S. L'hyperphosphorylation de pRB par des Cdk et sa régulation à la baisse sont associées à la prolifération cellulaire particulièrement à l'entrée en phase S alors que la différenciation est corrélée à une accumulation de mRNA de *RBI*. UHRF1 possède deux sites de liaison à pRB. UHRF1 et la forme hypophosphorylée de pRB co-immunoprécipitent et la surexpression

d'UHRF1 régule à la baisse l'expression de la protéine. De plus, UHRF1 est capable d'interagir avec le promoteur de gène *RBI* lorsque celui-ci est méthylé. Ceci suggère qu'UHRF1 est capable de réguler pRB à la fois au niveau protéique et au niveau transcriptionnel (Jeanblanc *et al.*, 2005).

Cette interaction contribuerait à diminuer l'expression de pRB quand les cellules entrent en phase S, c'est pourquoi UHRF1 pourrait être impliqué dans la dégradation de pRB probablement *via* la voie du protéasome puisqu'UHRF1 appartient à la famille des E3 ligases.

➔ L'absence d'UHRF1 interfère avec la prolifération des cellules cancéreuses suggérant qu'UHRF1 est indispensable pour soutenir l'expansion rapide des cellules cancéreuses (Unoki *et al.*, 2004).

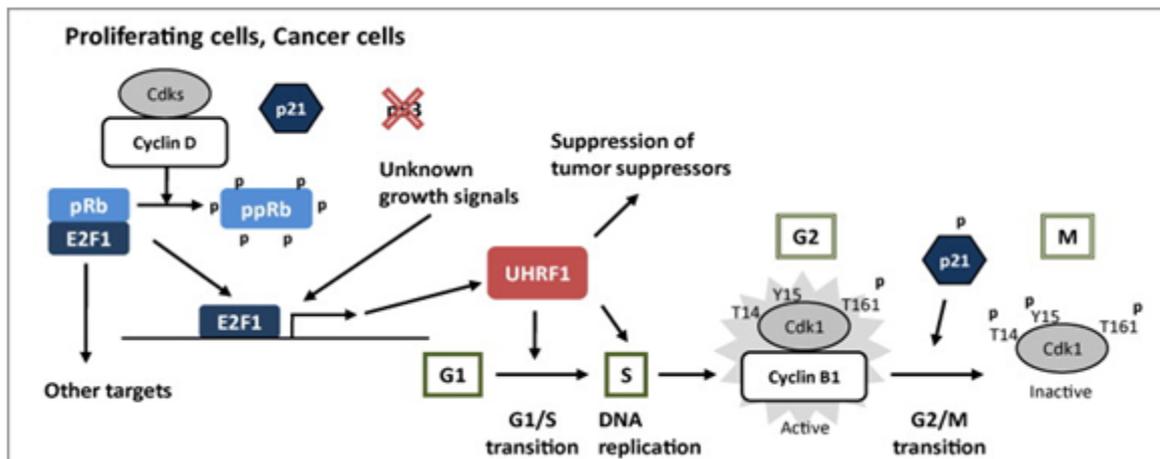


Figure 32 : Mécanisme d'action proposé d'UHRF1 dans les cellules cancéreuses. Dans les cellules en prolifération ou deS cellules cancéreuses, les fonctions de p53 sont abrogées, conduisant à l'activation subséquente de la cycline D / cdk. Le complexe actif cycline D / Cdk phosphoryle pRB , ce qui provoque l'activation de E2F1. E2F1 activé se lie au promoteur d'UHRF1 et l'active. Dans les cellules en prolifération, la réplication de l'ADN se produit. UHRF1 favorise également la transition G1 / S, puis le complexe cycline B1/Cdk1 est activé. La forme hyperphosphorylée de p21 peut activer l'activité kinase du complexe (Unoki *et al.*, 2009).

III.2.2. UHRF1, nouvelle cible thérapeutique dans le traitement des cancers ?

UHRF1 pourrait être utilisé à la fois comme un marqueur diagnostique et de pronostique ainsi que comme cible thérapeutique (Unoki *et al.*, 2009) (Figure 33). Les nouvelles générations de thérapies anticancéreuses se focalisent sur l'inhibition spécifique de protéines oncogéniques,

exprimées principalement dans les cellules cancéreuses, et essentielles pour la progression et la malignité. On s'attend à ce que ces nouvelles drogues aient moins d'effets secondaires de par leur spécificité pour les cellules cancéreuses. Ces thérapies comprennent les anticorps monoclonaux, les SiRNAs (small interference RNAs) et les peptides.

➡ Petits composés moléculaires ciblant certains domaines d'UHRF1 : la structure du domaine SRA d'UHRF1 est bien caractérisée, c'est pourquoi le design de petites molécules qui pourraient correspondre à ce domaine serait relativement aisé. Les cytosines méthylées (5mc) de l'ADN se fixent à l'intérieur d'une poche du domaine SRA. Ainsi, une molécule « 5mc-like » pourrait être un antagoniste d'UHRF1 bien qu'il ne soit pas certain que l'inhibition du seul domaine SRA soit suffisante pour interférer avec les fonctions oncogéniques d'UHRF1 (Unoki *et al.*, 2009). D'autres domaines pourraient également être la cible de nouvelles molécules. Les domaines PHD et RING d'UHRF1 possèdent des activités de liaison aux histones méthylées et une activité E3 ligase. Cibler ces domaines pourrait inhiber les effets oncogènes d'UHRF1.

➡ Les SiRNAs dirigés contre UHRF1 : l'utilisation des SiRNA-UHRF1 supprime la croissance cellulaire (Unoki *et al.*, 2004). C'est pourquoi leur utilisation thérapeutique semble intéressante dans le traitement des cancers. L'inconvénient majeur à l'heure actuelle est que les SiRNAs sont instables et rapidement dégradés souvent avant d'avoir atteint leurs cellules-cibles. Les recherches actuelles ont fait des progrès significatifs dans la délivrance des SiRNAs aux cellules cancéreuses (notamment en utilisant une propriété des cellules cancéreuses, leur hyperperméabilité vasculaire).

➡ Les peptides : UHRF1 interagit avec de nombreuses protéines (HDAC1, Dnmt1, G9a, H3K9...). L'utilisation de peptides qui correspondraient à une séquence partielle d'une de ces protéines entraînerait l'inhibition de certaines de ces liaisons et pourrait causer l'apoptose des cellules ou l'arrêt du cycle cellulaire.

➡ Vaccins : utilisation de peptides d'UHRF1 pour stimuler le système immunitaire des patients atteints de cancers. Ce type de vaccins n'a eu que peu de succès jusqu'à maintenant et l'une des raisons est qu'ils ont été testés sur des patients à des stades très avancés de cancers. Des effets plus importants sont attendus chez des patients à des stades plus précoces de la maladie.

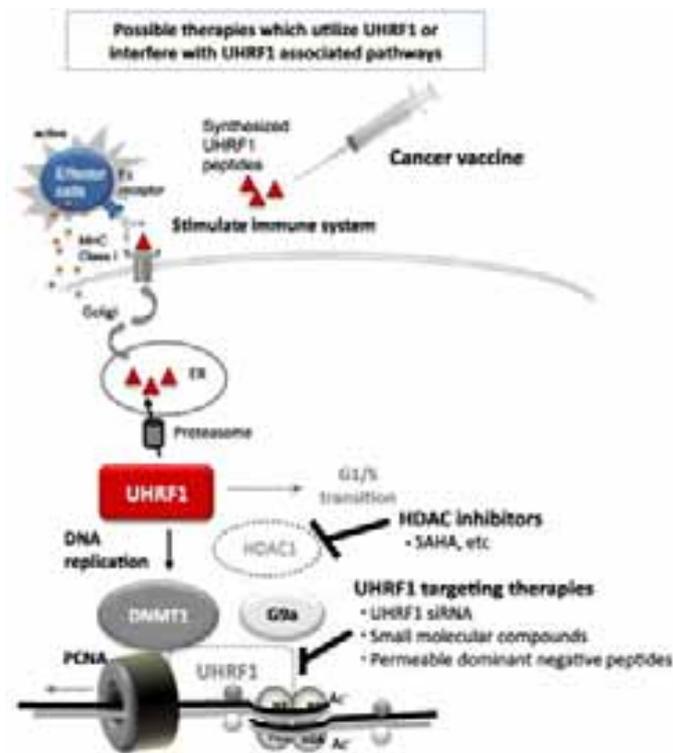


Figure 33 : Possibles thérapies moléculaires ciblant UHRF1 (Unoki *et al.*, 2009).

III.3. UHRF1 est associé à des nombreuses modifications épigénétiques

III.3.1. Généralités sur les altérations épigénétiques

La chromatine est la forme sous laquelle se présente l'ADN dans le noyau. Elle correspond à l'association de l'ADN et de protéines structurales appelées histones. Le nucléosome est l'unité fondamentale de la chromatine. Il correspond à l'enroulement de l'ADN autour de disques protéiques octamères d'histones. Quatre histones H2A, H2B, H3 et H4 forment le cœur et l'histone H1 permet la compaction des nucléosomes et rigidifie la structure hélicoïdale. Les extrémités N et C-terminales des histones sont le siège de modifications post-traductionnelles (Figure 34). Au niveau ultra-structural, on distingue l'euchromatine, peu

dense, transcriptionnellement active et riche en gènes, et l'hétérochromatine, dense, transcriptionnellement inactive et contenant peu de gènes et beaucoup de séquences répétées.

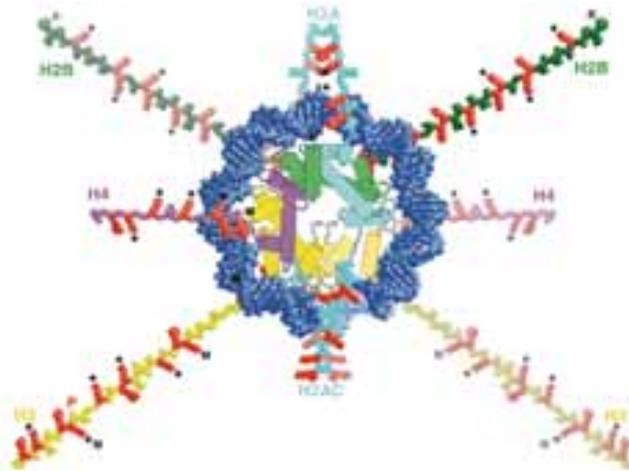


Figure 34 : Structure d'un nucléosome et modifications post-traductionnelles possibles sur la queue des histones. Les sites bien caractérisés de l'acétylation des lysines sont indiqués par un astérisque. Des sites de méthylation (M), le site de phosphorylation (P) dans la queue de l'histone H3 (Ser10), et de ribosylation (R) et d'ubiquitination (U) de H2A et H2B sont également indiquées (Wolffé et Hayes 1999).

Le contrôle de la structure chromatinienne est un mode de contrôle de l'expression génique. En effet, l'ADN pour être exprimé doit être décompacté ; un complexe de remodelage intervient donc pour désorganiser les histones afin de permettre la fixation des facteurs de transcription sur l'ADN et son expression.

La méthylation de l'ADN et les remodelages chimiques (modifications des histones) sont deux mécanismes permettant de moduler la structure chromatinienne.

III.3.1.1. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN joue un rôle central dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes chez les vertébrés. C'est un marqueur épigénétique utilisé pour placer sous silence certains gènes. Cette modification consiste en l'ajout d'un groupement méthyl sur une des quatre bases de l'ADN, la cytosine étant la plus fréquemment modifiée chez les mammifères. La méthylation est en partie responsable de l'inactivation des gènes. Chaque cellule aurait

donc un patron de méthylation qui déterminerait quels gènes sont inhibés. Ce patron est transmis aux cellules-filles après division cellulaire. Dans la majorité des cas, les groupements méthyles se retrouvent au sein de dinucléotides CpG dont 70 à 80% sont méthylés. Leur répartition n'est pas uniforme ; il existe des « îlots CpG », portions de génome à forte concentration en dinucléotides CpG, localisés au niveau des promoteurs et premiers exons des gènes, et leur non-méthylation est corrélée avec l'expression des gènes.

Une fois établie, la méthylation de l'ADN est le plus souvent stable pendant la mitose en particulier parce que maintenue après la réplication par Dnmt1 (DNA methyltransferase). Dnmt1 est la principale enzyme responsable du maintien de la méthylation des CpG, à savoir copier les méthylations pré-existantes sur le nouveau brin d'ADN après la réplication. Dnmt1 est essentielle pour la régulation de l'expression des gènes, l'embryogenèse et l'empreinte génomique (Li *et al.*, 1992, Jackson-Grusby *et al.*, 2001, Li *et al.*, 1993). Elle est indispensable en phase S du cycle cellulaire pour méthyler les CpGs nouvellement répliqués ce qui est essentiel pour la conservation de l'héritage épigénétique du génome. Elle méthyle préférentiellement les régions CpG héli-méthylées qui apparaissent après la réplication et les étapes de réparation de l'ADN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Goll%20MG%22%5BAuthor%5DGoll> et Bestor, 2005). Le recrutement de Dnmt1 à ces cibles implique la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) qui favorise la localisation de Dnmt1 aux foyers de réplication, mais PCNA n'est pas absolument requise pour ce processus (Spada *et al.*, 2007). Les mécanismes de recrutement de Dnmt1 à l'ADN hémiméthylé restent obscurs.

Les Dnmt 3a et 3b sont les méthylyltransférases *de novo* car elles sont responsables de la vague de méthylation post-implantatoire chez l'embryon ainsi que de la méthylation de séquences nouvellement intégrées. Elles sont capables de catalyser le transfert de groupements méthyles sur des substrats nucléotidiques héli-méthylés ou non-méthylés avec la même efficacité.

III.3.1.2. Modifications des histones

Le degré de condensation de l'ADN est régulé par des modifications des extrémités N-terminales des histones, comme des phosphorylations, acétylations, méthylations, ubiquitinations, sumoylations. L'ensemble de ces modifications étant catalysées par des enzymes spécifiques. Les modifications covalentes des histones agiraient soit directement en

modifiant la compaction de l'enroulement d'ADN autour des nucléosomes, soit indirectement en constituant des « marques » permettant le recrutement de protéines capables de modifier la structure de la chromatine (recrutement d'autres enzymes de modifications des histones ou remodelage physique de la chromatine). Les protéines sont recrutées aux modifications et se lient par l'intermédiaire des domaines spécifiques (Figure 35).

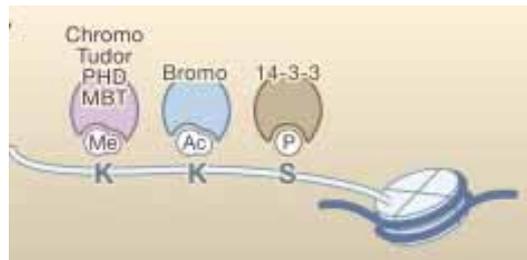


Figure 35 : Recrutement de protéines aux histones et domaines utilisés pour la reconnaissance des lysines méthylées, des lysines acétylées ou des sérines phosphorylées. La méthylation est reconnue par les domaines chromo-like (chromo, Tudor, MBT) et les domaines PHD, l'acétylation est reconnue par les bromo-domaines et la phosphorylation est reconnue par un domaine au sein des protéines, 14-3-3 (Kouzarides, 2007).

Les modifications des histones peuvent agir en combinaison ou séquentiellement, et une modification peut influencer une autre de façon synergique ou antagoniste. Certaines modifications seront héritées épigénétiquement.

L'acétylation s'effectue sur certains résidus lysine par des enzymes nommées histones acétyl transférases (HAT). L'acétylation est associée à une activation de la transcription et est facilement réversible grâce à l'action des histones désacétylases (HDAC). Elle induit un relâchement de la chromatine et permet ainsi une meilleure accessibilité aux autres facteurs de transcription. L'acétylation des histones permettrait également le recrutement d'activateurs de transcription. La méthylation peut s'effectuer soit sur des lysines, soit sur des arginines. C'est une modification stable et selon les résidus méthylés elle est associée à une activation (méthylation des arginines) ou une répression (méthylation des lysines) de la transcription. Plusieurs enzymes sont responsables de la méthylation des histones (G9a, Suv39h1, Ezh2). La méthylation des histones semble associée au recrutement d'effecteurs capables de modifier la structure de la chromatine (Kouzarides, 2007). La Lysine 9 de l'histone H3 est connue pour être associée à une répression de la chromatine environnante lorsqu'elle est méthylée.

III.3.2. UHRF1 et méthylation de l'ADN

Liaison à l'ADN méthylé

Précédemment, UHRF1 a été décrite comme pouvant interagir avec ICB2 (inverted CCAAT box) du promoteur du gène *Topo II α* . Cependant, il semble qu'UHRF1 ait une plus grande affinité pour les séquences méthylées (Unoki *et al.*, 2004) et peut se lier aux CpG méthylés par son domaine SRA (Unoki *et al.*, 2004). Le domaine SRA est constitué de 5 feuillets β , 3 feuillets β antiparallèles et 4 hélices α (Figure 36 a).

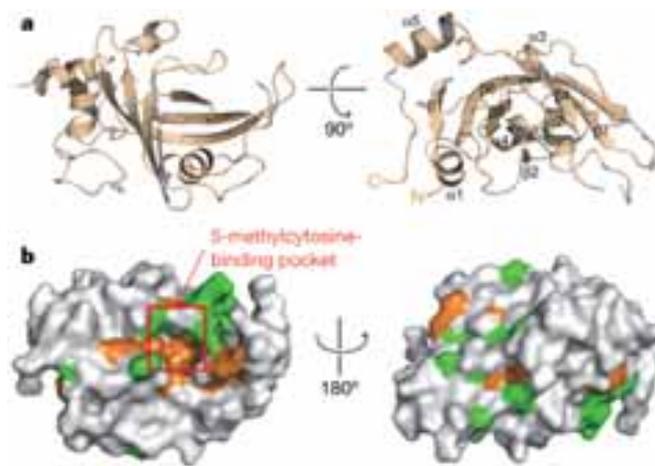


Figure 36 : a) Structure de domaine SRA. b) Répartition des résidus conservés à la surface du domaine SRA. Les résidus d'acides aminés sont colorés en fonction de leur niveau de conservation: orange : entièrement conservés, vert clair : substitutions conservatrices (Arita *et al.*, 2008).

L'ensemble possède une surface concave constituée de résidus très conservés, formant une poche hydrophobique (Figure 36 b) (Arita *et al.*, 2008, Avvakumov *et al.*, 2008, Hashimoto *et al.*, 2008). L'ADN hémiméthylé se loge dans cette poche (Figure 37).

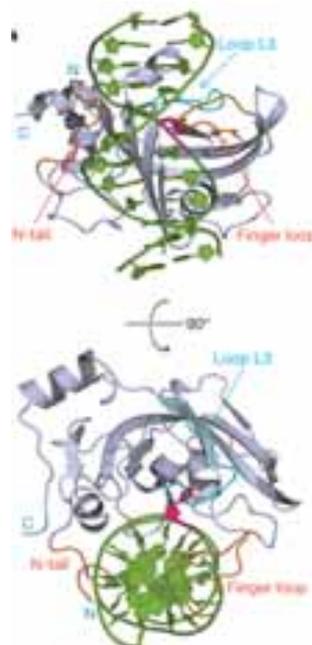


Figure 37 : Représentation du complexe SRA-ADN : gris : SRA, orange : N-ter et Finger-loop, bleu : boucle L3 du domaine SRA; vert clair : l'ADN; magenta : 5-méthyl cytosine (Arita *et al.*, 2008).

La cytosine méthylée de l'ADN est rejetée hors du duplex d'ADN et insérée dans la poche du domaine SRA (Arita *et al.*, 2008, Avvakumov *et al.*, 2008, Hashimoto *et al.*, 2008). Sa position est fixée par des interactions avec deux tyrosines notamment (Tyr 471 et 483). La guanidine orpheline et la cytosine cible de Dnmt1 sont reconnues par le domaine SRA et maintenues par des liaisons avec certains acides aminés du domaine SRA : la cytosine non méthylée du deuxième brin est associée à l'asparagine 494. La moindre affinité du domaine SRA pour l'ADN totalement méthylé pourrait résulter d'une interférence stérique entre Asn494 et le groupement méthyle du brin d'ADN (Figure 38) (Arita *et al.*, 2008).

La reconnaissance de cette séquence est favorisée par la capacité de l'arginine en position 491 à simultanément reconnaître les guanidines 6 et 7. Le remplacement de l'arginine en position 491 par une alanine entraîne une diminution de la liaison à l'ADN méthylé (Avvakumov *et al.*, 2008).

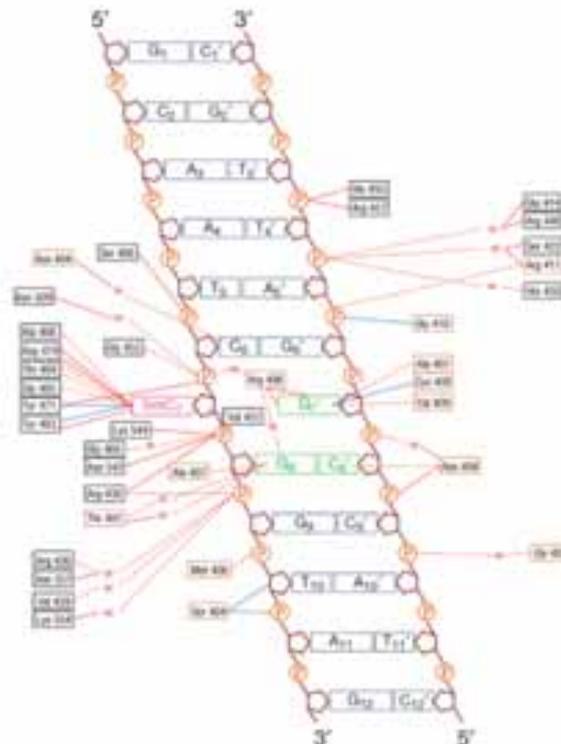


Figure 38 : Représentation schématique des interactions protéine-ADN. Les liaisons hydrogène entre SRA et l'ADN sont indiquées par des lignes rouges: en pointillés : les contacts de la chaîne principale; solides : les contacts de la chaîne latérale. Les liaisons de Van der Waals entre SRA et l'ADN sont indiquées par des lignes bleues. W, molécules d'eau médiant des interactions indirectes (Arita *et al.*, 2008).

Cette poche est spécifique des cytosines méthylées pour plusieurs raisons : premièrement elle est trop petite pour les purines ; deuxièmement, deux résidus aromatiques, Tyr478 et 466 interagissent spécifiquement avec les cytosines méthylées ; troisièmement, l'Asp469 se lie par liaison hydrogène à la cytosine méthylée (plutôt que la thymine) et enfin, elle renferme un methyl-group-binding site (Avvakumov *et al.*, 2008).

Recrutement de Dnmt1

Malgré une affinité intrinsèque pour l'ADN hémiméthylé, les mécanismes moléculaires qui assurent le recrutement de Dnmt1 à son substrat ne sont pas connus. En effet, Dnmt1 a une préférence 30 à 40 fois supérieure pour l'ADN hémiméthylé plutôt que pour l'ADN méthylé symétriquement. Mais ceci ne suffit pas à expliquer la haute fidélité avec laquelle cette enzyme assure le maintien de la méthylation. Il a été suggéré qu'UHRF1 faciliterait le recrutement de Dnmt1 aux sites appropriés du brin d'ADN nouvellement synthétisé. Le domaine SRA d'UHRF1 est adapté de façon unique à la reconnaissance spécifique des séquences CpG méthylées.

Dans les cellules délétées en *uhrf1*, Bostick *et al.*, (2007) ont observé une diminution massive de la méthylation de l'ADN. Ce phénotype n'est pas une conséquence secondaire d'une diminution des DNA méthyltransférases puisque les niveaux d'expression de ces enzymes ne sont pas réduits dans ces cellules. De plus, le knockdown d'UHRF1 réduit significativement l'association de Dnmt1 avec la chromatine. UHRF1 est donc requis pour le maintien de la méthylation de part son interaction directe avec Dnmt1 et il est nécessaire pour une association stable de Dnmt1 avec la chromatine. Ceci dans le but de faciliter le maintien fidèle de la méthylation après la réplication.

Les Dnmt1 méthylent la cytosine adjacente de la paire 5mC-G de l'ADN hémiméthylé. La cytosine pivote pour se retrouver dans une poche du domaine catalytique de Dnmt1. Le domaine catalytique de Dnmt1 approcherait du site de méthylation du côté opposé au domaine SRA d'UHRF1 (Arita *et al.*, 2008). Les deux domaines pouvant coexister sans incompatibilité stérique. La cytosine méthylée et la cytosine cible de Dnmt1 pivotent hors de la double hélice d'ADN successivement (Figure 39) premièrement pour la reconnaissance du statut de méthylation de l'ADN et dans un deuxième temps pour la méthylation. Cette association concertée assure la transmission correcte de la méthylation au brin nouvellement synthétisé.

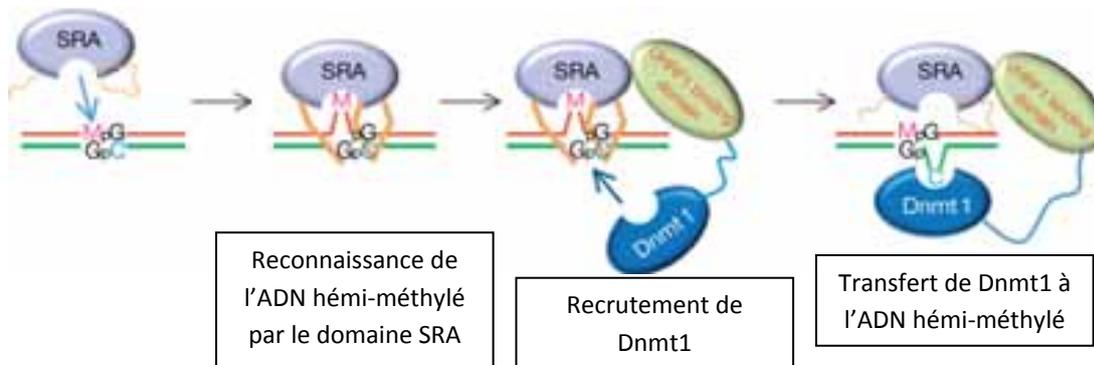


Figure 39 : Reconnaissance de l'ADN hémi-méthylé par le domaine SRA d'UHRF1. Modèle schématique montrant l'action conjointe d'UHRF1 et Dnmt1 pour le maintien de la méthylation (en rouge : le brin pré-existant d'ADN, en vert : le brin nouvellement synthétisé) (Arita *et al.*, 2008).

Le domaine SRA d'UHRF1 est nécessaire et suffisant pour assurer la liaison à l'ADN *in vitro* (Rottach *et al.*, 2009). L'absence d'UHRF1 entraîne une réduction de 75% de la méthylation génomique dans les cellules embryonnaires de souris (Cokus *et al.*, 2008).

D'autres activités d'UHRF1, comme sa liaison à l'histone H3K9me3 qui marque une hétérochromatine riche en CpG méthylés, pourraient également servir à la colocalisation de UHRF1 et Dnmt1 aux sites génomiques qui nécessitent une méthylation (Karagianni *et al.*, 2008).

L'association Dnmt1 et UHRF1 est impliquée dans le « gene silencing » de gènes suppresseurs de tumeur comme *RBI* et *p16^{INK4A}* (Bostick *et al.*, 2007, Achour *et al.*, 2008, Jeanblanc *et al.*, 2005) et est un pré-requis pour l'expression du gène *VEGF* probablement par régulation négative du gène *p16^{INK4A}* (Achour *et al.*, 2008).

De plus, l'action concertée de Dnmt1 et d'UHRF1 serait impliquée dans l'inactivation par méthylation du programme de différenciation des cellules progénitrices (Sen *et al.*, 2001). L'absence de Dnmt1 et d'UHRF1 dans des cellules progénitrices épidermiques induit une différenciation prématurée et une perte de la capacité du tissu à se renouveler. En l'absence de Dnmt1, les cellules sortent prématurément de la phase S, sont arrêtées en phase G1 et ne prolifèrent plus. Ceci serait dû à la capacité de Dnmt1 d'inhiber l'expression d'inhibiteurs des Cdks.

Meilinger *et al.*, (2009) ont également mis en évidence l'interaction de Np95 avec Dnmt3a et 3b.

III.3.3. UHRF1 et modification des histones

UHRF1 est capable de recruter plusieurs enzymes responsables de modifications de la chromatine et serait un élément-clé dans la répression des gènes-cibles.

Le domaine SRA d'UHRF1 recrute HDAC1 (Unoki *et al.*, 2004). UHRF1 est également capable de se lier à G9a qui est une histone lysine méthyltransférase qui méthyle plus particulièrement l'histone H3K9. UHRF1 recrute et coopère avec G9a pour inhiber l'activité du promoteur de p21 (Kim *et al.*, 2009) qui est un régulateur du cycle cellulaire (inhibition des cdk) et de l'apoptose. UHRF1 régule l'expression de p21, permettant une prolifération des cellules, notamment des cellules tumorales.

La méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 est impliquée dans la répression transcriptionnelle ou encore la formation de l'hétérochromatine. Les effets biologiques de la méthylation des histones sont médiés par des protéines effectrices qui reconnaissent et se lient à des profils spécifiques de méthylation. Kariagianni *et al.*, (2008) ont identifié UHRF1 comme étant une nouvelle protéine capable de se lier spécifiquement à H3K9me. Ceci implique à la fois le domaine PHD (qui définit la spécificité de liaison) et le domaine SRA (qui favorise l'activité de liaison) d'UHRF1. H3K9me est nécessaire pour la localisation correcte d'UHRF1 et Np95 à l'hétérochromatine mais UHRF1 est nécessaire à la stabilisation de H3K9me. De plus, UHRF1 serait nécessaire pour l'organisation de la chromatine. En effet, UHRF1 possède une activité E3 ligase à l'égard de H3 et cette activité semble impliquée dans le formation et/ou le maintien de l'hétérochromatine (Karagianni *et al.*, 2008). Les auteurs proposent un modèle dans lequel UHRF1 se lierait à l'histone H3 méthylé et ainsi favoriserait l'ubiquitination locale de la chromatine. Cet événement pourrait servir de signal pour le recrutement de molécules telles des méthyltransférases ou des désacétylases qui induiraient la formation de l'hétérochromatine.

Tip60 est une histone acétyltransférase qui contrôle l'acétylation des histones H2A (H2AK5) et H4 (H4K5, 8, 12 et 16). Elle est impliquée dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et dans les mécanismes de réparation de l'ADN (Kimura et Horikoshi, 1998, Squatrito *et al.*,

2006, Ikura *et al.*, 2000). Achour *et al.*, (2009) ont montré que Tip60 faisait partie de la plateforme épigénétique formée par UHRF1, Dnmt1 et HDAC1. L'acétylation de l'histone H2A est dépendante de la présence d'UHRF1. En effet, les cellules transfectées avec des SiRNA d'UHRF1 présentent une diminution de l'acétylation de l'histone H2A associée à une augmentation d'expression de Tip60. La capacité d'UHRF1 à recruter Tip60 pour réguler l'acétylation de l'histone H2A entraînerait une stabilisation du génome. UHRF1 recrute et module les niveaux d'expression de Tip60 (Achour *et al.*, 2009). La méthylation de l'ADN, l'acétylation de l'histone H2A et l'expression d'UHRF1 sont affectées dans les cellules cancéreuses. Ceci suggère que la dérégulation de l'expression d'UHRF1 pourrait influencer l'acétylation des histones par la modulation de l'expression et/ou de l'activité de Tip60. La diminution d'expression de Tip60 observée dans les cellules cancéreuses pourrait être gouvernée par UHRF1 qui régule négativement cette enzyme.

Le domaine TTD d'UHRF1 est composé de deux sous-domaines formant une poche hydrophobique qui peut accueillir la partie N-terminale de l'histone H3 triméthylée sur la lysine 9 (Rottach *et al.*, 2009). Cette poche est créée par 3 acides aminés très conservés (Phe152, Tyr188, Tyr191) qui forment une cage aromatique. Il est capable de lier l'histone H3 triméthylée.

III.3.4. UHRF1, élément central dans les interactions épigénétiques (interconnexion entre la méthylation de l'ADN et la modification des histones)

La méthylation de l'ADN ainsi que la modification des histones jouent un rôle important dans la modulation de la structure de la chromatine et de ce fait contrôlent l'expression des gènes, la différenciation cellulaire, la stabilité du génome. Alors que chacune de ces modifications épigénétiques a été le sujet d'études intensives, leur interconnexion n'est pas bien connue.

UHRF1 est une molécule unique qui relie la méthylation de l'ADN, la méthylation des histones, la désacétylation et l'ubiquitination des histones et la formation de l'hétérochromatine par son interaction avec les CpG méthylés, l'histone H3 méthylée, HDAC1, G9a (Figure 40). Ceci favorise la formation d'hétérochromatine, chromatine inactive au niveau transcriptionnel. De plus, l'activité E3 ligase d'UHRF1 ubiquitinye l'histone H3. Il est connu que l'ubiquitination de l'histone H3 est requise pour l'initiation de la transcription, l'élongation, la répression des gènes et la réparation de l'ADN.

Ces multiples interactions placent UHRF1 au centre de plusieurs mécanismes épigénétiques impliqués dans le « gene silencing ».

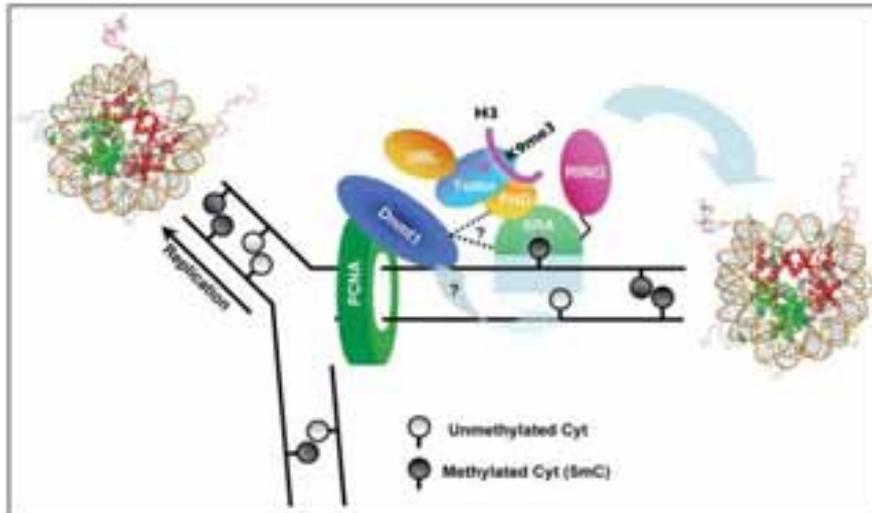


Figure 40 : Modèle d'interférence d'UHRF1 avec la méthylation de l'ADN et les modifications des histones (Hashimoto *et al.*, 2009). Le domaine SRA d'UHRF1 reconnaît l'ADN méthylé puis il recrute Dnmt1 pour méthyler le brin d'ADN nouvellement synthétisé. UHRF1 recrute G9a pour méthyler l'histone H3K9 qui se lie ensuite aux domaines Tudor ou PHD. UHRF1 recrute alors HDAC1 et désacétyle les histones. Les histones se chargent alors positivement et se lient à l'ADN chargé négativement, entraînant la formation de l'hétérochromatine.

L'expression de *BRCA1* est intimement liée à la pathogénèse des cancers du sein et est habituellement supprimée dans les tissus de ce cancer. Jin *et al.*, (2009) ont montré qu' UHRF1 induisait des changements épigénétiques impliquant la méthylation de l'ADN, des modifications des histones (déacétylation et méthylation) et le remodelage de la chromatine sur le promoteur du gène *BRCA1* entraînant son inactivation dans le cancer du sein sporadiques. UHRF1 et HDAC1, DNMT1, G9A forment un complexe inhibant la transcription du promoteur du gène *BRCA1* dans les tumeurs du sein.

OBJECTIFS

Objectifs

T. gondii persiste dans certains organes immunologiquement privilégiés comme le cerveau ou l'œil, où l'inflammation est limitée et la destruction tissulaire liée à la cytolysse est réduite afin de préserver l'intégrité fonctionnelle de l'organe infecté (Black and Boothroyd, 2000). Le parasite persiste au sein d'une vacuole parasitophore où il redistribue les organites intracellulaires, en particulier les mitochondries, module la transcription, interfère avec de nombreux mécanismes physiologiques cellulaires. Par microarrays, plus de mille gènes se sont avérés être régulés négativement ou positivement par l'infection. Ces gènes ont été classés en trois classes distinctes : les gènes pro-hôte, requis pour la défense de l'hôte, les gènes pro-parasite, nécessaires à la croissance du parasite et les gènes by-stander, incidemment modulés par un gène des deux classes précédentes. Parmi les gènes pro-hôtes, on note l'*IFN-γ*, ou l'*IL-12*. Les gènes pro-parasite vont coder diverses protéines nécessaires pour: 1) palier à l'auxotrophie du parasite (cholestérol, tryptophane, bases puriques), 2) bloquer l'apoptose des cellules infectées, ou 3) favoriser la croissance du parasite. *T. gondii* manipule certains facteurs de transcription et notamment NF-κB, HIF-1, STAT3. Les interactions du parasite avec les voies de signalisation de la cellule-hôte restent largement méconnues.

L'objectif de ce travail est l'étude de nouvelles voies de signalisation cellulaire modifiées par la présence intracellulaire de *T. gondii*. Plus particulièrement, deux questions auxquelles nous avons tenté de répondre durant mon travail de thèse : 1) L'infection des cellules-hôte par *T. gondii* induit-elle une dérégulation du cycle cellulaire ? 2) UHRF1 est-il un nouveau facteur de transcription modulé par le parasite ?

- 1) L'étude du transcriptome des cellules infectées a permis une meilleure compréhension des voies de signalisation et des processus métaboliques exploités par le parasite afin de créer un environnement favorable à sa réplication. Peu d'attention a été accordée cependant à

déterminer si des changements affectaient le cycle cellulaire de la cellule-hôte bien que se soit un mécanisme largement utilisé par les virus comme le VIH. Cette modulation du cycle cellulaire des cellules infectées permettrait une transcription plus efficace et une meilleure réplication virale (He *et al.*, 1995). Dans le cas d'une infection par *T. gondii*, plusieurs protéines ayant des fonctions-clés lors de la mitose sont régulées lors de l'infection (Nelson *et al.*, 2008). De plus, des changements affectant le cycle cellulaire de la cellule-hôte moduleraient le développement de *T. gondii* et notamment le processus d'interconversion (Radke *et al.*, 2006). Nous avons donc émis l'hypothèse que *T. gondii* pouvait induire une modulation du cycle cellulaire de la cellule-hôte infectées.

- 2) Le facteur de transcription UHRF1, découvert par mon co-directeur de thèse, présente des propriétés anti-apoptotiques, des propriétés de modulation du remodelage de la chromatine et il joue un rôle crucial dans la régulation du cycle cellulaire. *T. gondii* module l'expression de gènes (E2F, Rb, p53, p21, ERK), qui régulent ou sont régulés par UHRF1. De plus, UHRF1 possède de nombreux sites de liaison à NF- κ B, un facteur de transcription activé lors de l'infection. Nous avons émis l'hypothèse, qu'UHRF1 pourrait être un nouveau facteur de transcription dont l'expression serait modulée par le parasite, lui permettant ainsi de contrôler la machinerie de la cellule-hôte et notamment l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose.

Ce manuscrit se divise en trois parties :

- 1) **Etude de l'influence de *T. gondii* sur le cycle cellulaire des cellules-hôtes infectées et la prolifération cellulaire, et implication du facteur de transcription UHRF1 dans la prolifération parasitaire ;**
- 2) **Etude des mécanismes de régulation du gène de la *cycline B* dans les cellules infectées et altérations épigénétiques induites par l'infection ;**
- 3) **Etude de la régulation de l'expression d'UHRF1 dans les cellules infectées par *T. gondii*.**

Ces objectifs seront mis en œuvre *in vitro* dans un modèle cellulaire utilisant les cellules trophoblastiques BeWo, hormonosécrétantes et à potentiel syncytial. Ce modèle cellulaire est un modèle largement utilisé au sein de notre laboratoire notamment pour étudier le passage

transplacentaire du parasite et dans lequel *T. gondii* prolifère et persiste (Pfaff *et al.*, 2005). L'ensemble de ce travail a été réalisé avec une souche RH de type I mais sera également complété en utilisant d'autres souches de virulences variées comme une souche Pru de type II ou les souches atypiques Lef et RUB.

RESULTATS ET DISCUSSION

Partie 1 : Rôle d'UHRF1 dans la régulation du cycle cellulaire des cellules-hôtes infectées et son influence dans la prolifération intracellulaire de *T. gondii*

Partie 2 : Etude des mécanismes de régulation du gène de la *cycline B* dans les cellules infectées et altérations épigénétiques induites par l'infection

Partie 3 : Modulation de l'expression d'UHRF1 dans les cellules infectées par *T. gondii*

PARTIE I : Rôle d'UHRF1 dans la régulation du cycle cellulaire des cellules-hôtes infectées et son influence dans la prolifération intracellulaire de *T. gondii*

Toxoplasma gondii est capable de modifier le fonctionnement de la cellule qui l'héberge en détournant à son profit les métabolismes de celle-ci afin de s'y multiplier et établir une infection chronique. La connaissance de mécanismes physiopathologiques régissant les relations hôte-parasite est donc essentielle pour une meilleure compréhension de la persistance intracellulaire du parasite et pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

La première partie de ce travail a permis de mettre en évidence un nouveau point d'impact de *T. gondii*, le cycle cellulaire de la cellule-hôte, ainsi qu'un nouveau facteur de transcription, UHRF1 manipulé par le parasite et essentiel pour sa prolifération.

I. L'infection par *T. gondii* induit une dérégulation du cycle cellulaire de la cellule-hôte infectée

Parmi les gènes dont l'expression est modifiée lors de l'infection, certains comme EGR1, sont impliqués dans la prolifération cellulaire (Molestina *et al.*, 2005). EGR1 contrôle l'expression de gènes comme ceux des cytokines, des facteurs de croissance, des protéases et de nombreux autres impliqués dans la tumorigenèse. Dans les fibroblastes infectés par *T. gondii*, l'expression des gènes codant pour la cyclin D1 ou FGF7 (Fibroblast Growth Factor 7) est également modulée (Blader *et al.*, 2001). Ceci pourrait avoir pour conséquence, une modulation du cycle cellulaire des cellules-hôtes infectées.

La régulation du cycle cellulaire des cellules infectées est un mécanisme largement reconnu et utilisé par les virus. Par exemple, le virus VIH-1 possède une protéine virale Vpr qui arrête la progression du cycle cellulaire en phase G2/M, en empêchant l'activation du complexe cycline B/Cdk1 qui est requis pour l'entrée en mitose et en activant p21. L'arrêt du cycle cellulaire est accompagné d'une inhibition presque complète de l'activité de la kinase Cdk1 (He *et al.*, 1995). Vpr bloque la déphosphorylation de Cdk1, déphosphorylation requise pour la transition des cellules en mitose puisqu'elle inhibe Cdk1. De plus, Vpr inhibe la

phosphatase Cdc25, active la kinase Wee1 pour promouvoir la phosphorylation de Cdk1 (Yuan *et al.*, 2004, Elder *et al.*, 2000, Zhao et Elder., 2005). L'activation de Wee1 serait due à une cascade de phosphorylations impliquant PP2A (Protein Phosphatase 2 A) (Elder *et al.*, 2001). L'arrêt en phase G2 du cycle cellulaire des cellules infectées permettrait une transcription plus efficace et une meilleure réplication virale.

Parmi les Apicomplexae, l'exemple le plus frappant est celui de *Theileria*. L'infection entraîne une prolifération incontrôlée des lymphocytes infectés, ceci impliquant probablement une activation de certaines voies de signalisation par le parasite (TNF, PI3 kinase, NF-κB) (Guernon *et al.*, 2003). *Leishmania*, un parasite intracellulaire obligatoire des macrophages, inhibe la prolifération cellulaire (arrêt des cellules en phase G0/G1) *via* les inhibiteurs des Cdks, p21 et p27 (Kuzmenok *et al.*, 2005).

Peu de choses sont connues sur l'impact de *T. gondii* sur la prolifération et le cycle cellulaire des cellules infectées. Des études préliminaires ont étudié l'influence du cycle cellulaire sur la susceptibilité des cellules à l'infection (Youn *et al.*, 1991, Grimwood *et al.*, 1996). Les auteurs ont montré que l'attachement du parasite à la cellule-hôte faisait intervenir une interaction spécifique *via* des récepteurs présents, à une fréquence plus élevée durant la phase S du cycle cellulaire de la cellule-hôte. L'attachement du parasite à la cellule-hôte diminue lorsque celle-ci progresse en phase G2. Radke *et al.*, (2006) ont également montré que le statut de prolifération de la cellule-hôte définissait un environnement plus ou moins favorable au développement parasitaire. CDA1 (cell division auto-antigen-1) régule négativement le cycle cellulaire et son activité est modulée par sa phosphorylation par certains couples cycline/Cdk (Chai *et al.*, 2001). La surexpression de CDA1 dans les cellules entraîne un arrêt de la prolifération cellulaire et inhibe la synthèse de l'ADN en phase S. Ceci s'accompagne d'une activation et d'une augmentation d'expression de p21, inhibiteur des Cdks (Tu *et al.*, 2007). La surexpression de CDA1 dans les cellules infectées inhibe la réplication parasitaire et induit l'expression de protéines spécifiques des bradyzoïtes (Radke *et al.*, 2006). Ceci suggère que des changements affectant le cycle cellulaire de la cellule-hôte et sa machinerie sont capables à leur tour de moduler le développement de *T. gondii* en modifiant l'environnement intracellulaire de la cellule qui l'héberge.

La possibilité d'une modulation par *T. gondii* du cycle cellulaire de la cellule-hôte ainsi que de sa prolifération est soutenue par plusieurs observations : le recrutement du MTOC à la membrane de la vacuole parasitophore et la réorganisation de microtubules pourraient compromettre la progression du cycle cellulaire vers la mitose (Coppens *et al.*, 2006) ;

plusieurs protéines (dynactine 2, lamine B2 et la prohibitine) ayant des fonctions-clés lors de la mitose sont régulées lors de l'infection (Figure 41) (Nelson *et al.*, 2008). Ces deux mécanismes pourraient interférer avec l'initiation et la progression du cycle cellulaire en mitose.

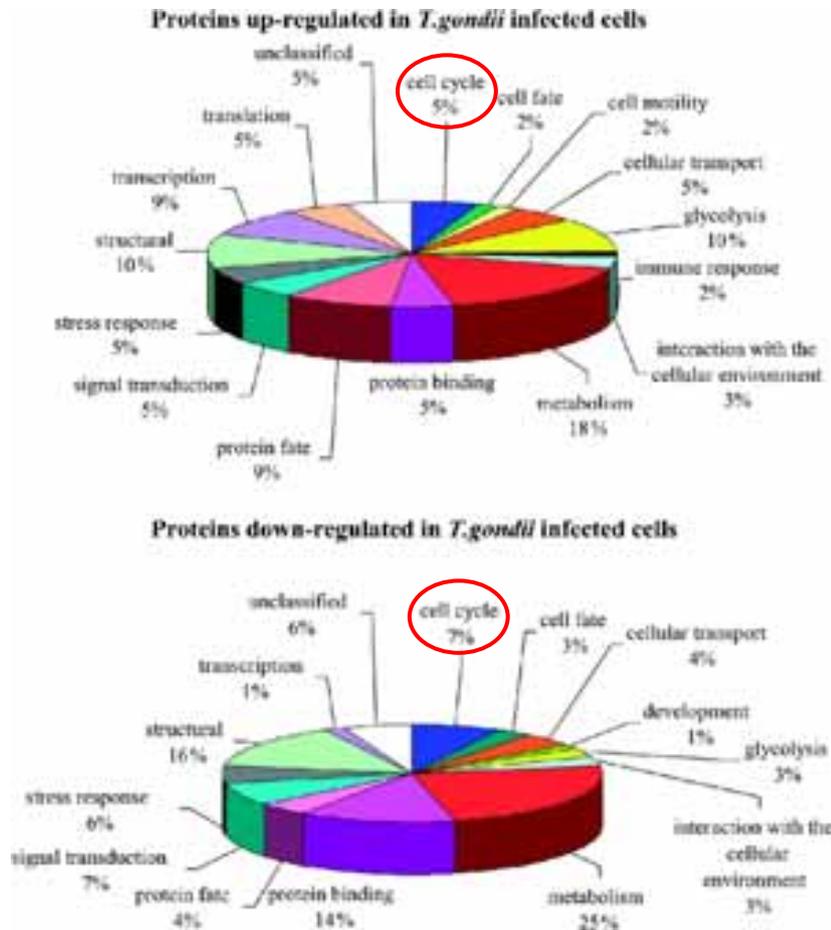


Figure 41 : Diagramme montrant la répartition par catégorie fonctionnelle des protéines modulées lors de l'infection par *T. gondii*. Le diagramme du haut montre les protéines régulées positivement et celui du bas montre les catégories fonctionnelles de protéines régulées négativement durant l'infection (Nelson *et al.*, 2008).

I.1. *T. gondii* induit un arrêt de prolifération ainsi qu'un arrêt en phase G2/M du cycle cellulaire des cellules infectées

Dans cette première partie de notre travail, nous nous sommes attachés à analyser l'éventuelle dérégulation du cycle cellulaire de la cellule-hôte infectée par *T. gondii*. Par cytométrie en flux, nous avons analysé le cycle cellulaire des cellules infectées par *T. gondii*. Nos données

montrent que le parasite induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 et une inhibition de la prolifération des cellules-hôtes infectées. Le parasite empêche donc le passage des cellules infectées en mitose ce qui explique l'arrêt de la prolifération cellulaire. Il est intéressant de noter qu'une autre équipe a également mis en évidence une dérégulation du cycle cellulaire des cellules infectées par *T. gondii* (Molestina *et al.*, 2008). De plus, cette équipe a montré que dans les cellules infectées, il y avait peu de changement du profil d'expression de gènes impliqués dans la régulation du déroulement de la mitose, ce qui est compatible avec l'apparent blocage de la réponse mitotique.

Nous avons également observé que le parasite avait la capacité de provoquer le passage de la phase G0/G1 à S puis G2/M de fibroblastes à confluence ou de cellules synchronisées en phase G1. Ceci pourrait signifier que *T. gondii* préfère et maintient la cellule infectée en phase G2 pour sa prolifération. Lavine *et al.*, (2008) ont également observé que le parasite affectait le cycle cellulaire des cellules infectées mais également celui des cellules voisines non infectées. *T. gondii* relargue ou induit le relarguage, par les cellules infectées, d'un facteur qui induit l'entrée en phase S des cellules voisines non infectées. Ceci pourrait permettre une adhésion et une invasion plus rapide des cellules par les parasites extracellulaires.

I.2. Profils d'expression des protéines régulatrices du cycle cellulaire en réponse à l'infection

La progression du cycle cellulaire des cellules eucaryotes met en jeu l'activation et l'inactivation des Cdks en association avec leur cycline respective. L'entrée en mitose est dépendante du couple cycline B/Cdk1. L'activation complète des Cdks, nécessaire pour la progression normale du cycle cellulaire, requiert leur liaison à une cycline, la suppression des phosphorylations inhibitrices et la présence d'une phosphorylation activatrice. La phosphorylation inhibitrice sur 2 acides aminés voisins (tyrosine 15 et thréonine 14) est réalisée par la protéine kinase Wee-1 et supprimée par la famille des protéines phosphatases Cdc25. La phosphorylation activatrice est réalisée sur les résidus thréonine 161 ou 160 par les kinases CAKs (Figure 42).

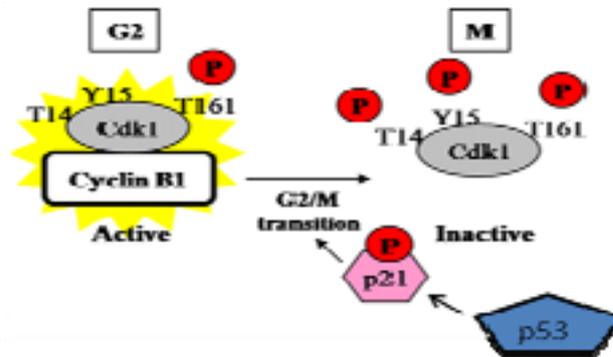
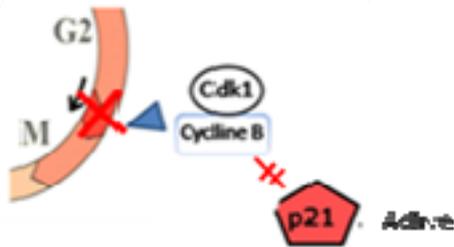
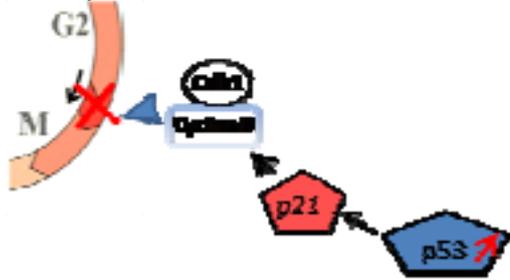
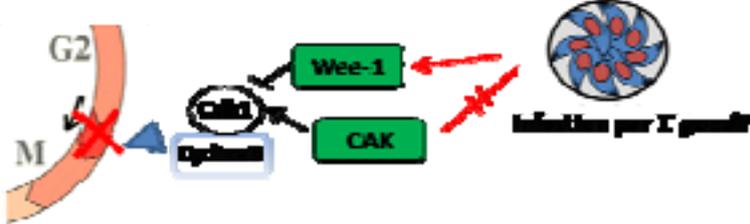
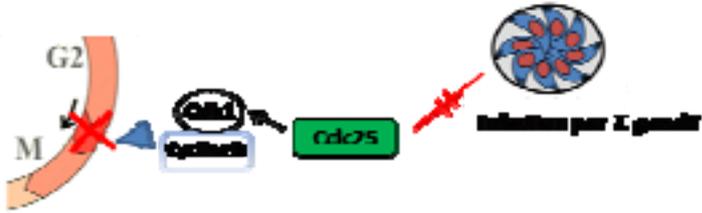


Figure 42 : Transition G2/M (d'après Brunet *et al.*, 2008).

L'arrêt en phase G2 du cycle cellulaire des cellules infectées peut se faire par la modulation d'une ou de plusieurs molécules-clés impliquées dans cette transition :

Point d'impact	Mécanismes proposés
Cycline B	<p>Une dégradation ou inhibition de synthèse de la cycline B impliquerait une absence de formation possible du complexe cycline B/Cdk1</p>
Cdk1	<p>- Une phosphorylation inhibitrice de Cdk1 sur la Tyr15 et la Thr14 inactiverait Cdk1. C'est le mécanisme proposé dans le cas du VIH. - Une absence de phosphorylation activatrice sur la Thr161 de Cdk1 l'inactiverait.</p>

<p>p21</p>	<p>p21 serait sous sa forme non phosphorylée donc active et inhiberait le cycle cellulaire</p> 
<p>p53</p>	<p>L'augmentation d'expression de p53 activerait p21 et inhiberait la progression du cycle cellulaire vers la mitose</p> 
<p>Kinases : Wee-1 et CAK</p>	<p>- L'activation de Wee-1 phosphorylerait les sites de phosphorylation inhibitrice de Cdk1 et l'inhiberait (point d'impact avéré de la protéine Vpr du VIH) - L'inhibition de CAK induirait l'absence de phosphorylation de les thréonine 160 et/161.</p> 
<p>Phosphatase : Cdc25</p>	<p>L'inhibition de Cdc25 induirait l'absence de déphosphorylation de la tyrosine et de la thréonine et inactiverait Cdk1 (point d'impact avéré de la protéine Vpr du VIH)</p> 

Par Western Blot nous avons analysé l'expression de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire.

Dans le cas de l'infection par *T. gondii*, nous avons constaté une rapide diminution de la cycline B dans les cellules infectées, l'origine de cette baisse restant à explorer.

Si l'expression de Cdk1 totale reste inchangée, l'expression de sa forme inactive Tyr15-phosphorylée augmente après 3 h d'infection puis diminue progressivement parallèlement à la baisse de la cycline B, laissant la forme active croître proportionnellement, sans pour autant surmonter l'arrêt du cycle en phase G2/M. En même temps, la p21 voit sa forme hyperphosphorylée, qui favorise la transition G2/M augmenter. Quant à p53, elle augmente jusqu'à 6h puis décroît. La diminution de l'expression de p53 est en corrélation avec la résistance à l'apoptose observée dans les cellules infectées. L'inactivation de p21 pourrait favoriser le développement de bradyzoïtes. En effet, dans le cas du VIH, l'activation de p21 est associée à la réplication virale dans les macrophages et son inactivation favoriserait la forme de latence du virus (Chowdhury *et al.*, 2003, Vázquez *et al.*, 2005, Cherrier *et al.*, 2009).

La régulation négative du gène de la *cycline B* semble être responsable de l'arrêt en phase G2 du cycle cellulaire puisque les autres molécules impliquées dans la régulation de la phase G2/M sont normalement régulées.

Cependant, nous n'avons pas étudié l'état de phosphorylation activatrice de la thréonine et l'on ne peut exclure un effet de l'infection, en l'occurrence une déphosphorylation, sur les thréonines 160 ou 161. Les phosphatases PP2C (Ser/Thr protein phosphatases C) déphosphorylent la phosphorylation activatrice des Cdks. Cette déphosphorylation est impossible lorsque les cyclines sont liées aux Cdks (Cheng *et al.*, 1999, De Smedt *et al.*, 2002). Ainsi, la surexpression de PP2C dans les cellules induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M pouvant impliquer potentiellement deux voies de régulation : 1) une déphosphorylation directe de Cdk1 sur la thréonine 161 ; 2) l'induction de l'expression de p21 par l'activation de p53 (Ofek *et al.*, 2003). Dans cette deuxième voie, p21 bloquerait le complexe Cycline B / Cdk 1 provoquant ainsi le maintien de l'arrêt en G2. La protéine p21 peut, soit inhiber Cdk1, soit bloquer la CAK. Une protéine de rhoptrie toxoplasmique a récemment été retrouvée dans le noyau de la cellule-hôte et elle présente des homologies de séquence avec les protéines PP2C. On ne connaît pas encore le substrat de cette PP2C toxoplasmique dans le noyau de la cellule-hôte mais Cdk1 pourrait en être un. De plus, l'activité de PP2C s'exerçant sur les Cdks qui ne sont pas complexées à leur cycline l'absence de cycline B dans les cellules infectées favoriserait l'action de PP2C. Ainsi, la PP2C toxoplasmique pourrait participer à l'arrêt du cycle cellulaire des cellules-hôtes infectées en phase G2. Ceci pourrait être vérifié en utilisant des parasites Knock down pour PP2C ou en utilisant des inhibiteurs de cette phosphatase.

La kinase Wee et la phosphatase Cdc25 sont régulées par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation. Nous élargirons nos analyses qualitatives à d'autres cibles potentielles par une étude de la variation de la phosphorylation par Bioplex de molécules impliquées dans la régulation de la transition G2/M : Wee-1 (qui est inhibée par phosphorylation) ou Cdc25 (qui est activée par phosphorylation).

La diminution d'expression de la cycline B observée jusqu'à 24 heures d'infection semble être responsable de l'arrêt en phase G2 du cycle cellulaire bien que les mécanismes y contribuant ne soient pas élucidés. Le facteur de transcription UHRF1 est reconnu comme étant impliqué dans la régulation du cycle cellulaire lors de la phase G1/S. Il est indispensable à la progression du cycle cellulaire des cellules infectées par *T. gondii* vers la phase S et G2/M puisque les cellules transfectées par des SiRNA-UHRF1, synchronisées ainsi en phase G1, restent bloquées dans cette même phase.

Nos résultats suggèrent donc que le parasite induit une entrée en phase S des cellules infectées (en contrôlant UHRF1) et perturbe le processus mitotique en bloquant ces cellules en G2/M (Figure 43). La perturbation du cycle cellulaire des cellules-hôtes impacterait le propre schéma de prolifération intracellulaire du parasite lui-même. Les mécanismes par lesquels le parasite régulerait l'expression d'UHRF1 restent encore à élucider. UHRF1 est notamment régulé par le facteur de transcription E2F1. L'expression de celui-ci étant augmentée par l'infection (Molestina *et al.*, 2008), il pourrait participer, sous le contrôle du parasite, à la modulation de l'expression d'UHRF1 dans les cellules-infectées.

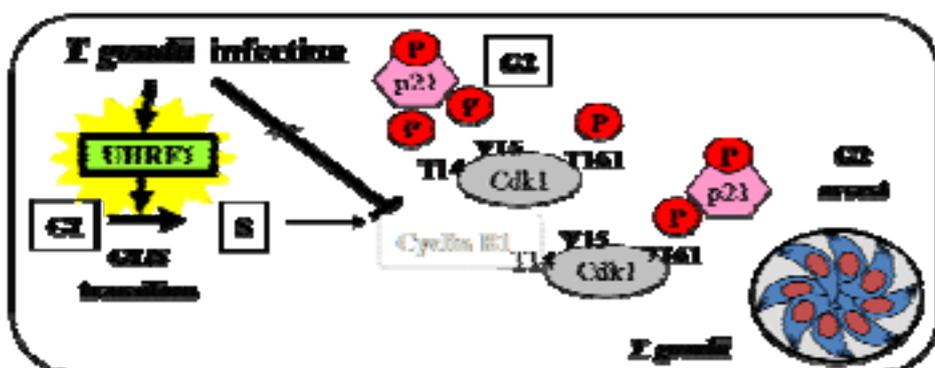


Figure 43 : Mécanisme proposé d'association entre la cellule-hôte et *T. gondii* (Brunet *et al.*, 2008).

Il existe de multiples avantages pour *T. gondii* à arrêter le cycle cellulaire de la cellule-hôte. On peut penser que les structures cellulaires de l'hôte avec lesquelles le parasite interagit

(comme le MTOC) ne soient pas accessibles à d'autres stades du cycle cellulaire que le stade G2/M (Walker *et al.*, 2008). De plus, le parasite induit une réorganisation des microtubules de la cellule-hôte autour de la vacuole parasitophore essentiellement pour l'acquisition de nutriments comme les lipides (Figure 44). Cette réorganisation pourrait être compromise par la poursuite de la progression du cycle cellulaire vers la mitose. Cette intime association entre le parasite et les microtubules de la cellule-hôte pourrait induire une suppression de la division cellulaire et/ou causer le défaut de passage en mitose observé dans les cellules infectées.

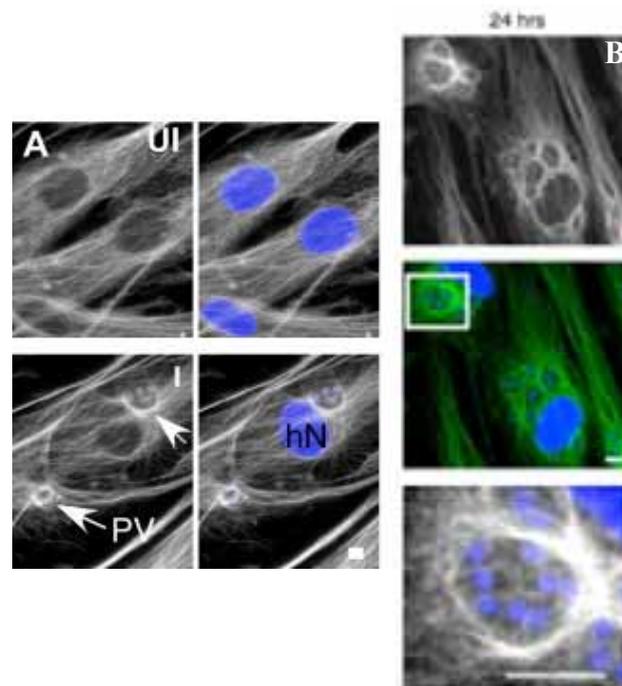


Figure 44 : Réorganisation des microtubules dans les cellules infectées par *T. gondii*. A) Les cellules non infectées (UI) ou infectées (I) sont fixées et marquées avec l'anti- α -tubuline et le DAPI (bleu). Une accumulation des microtubules est observée autour de la vacuole parasitophore (PV). Les microtubules se réorganisent autour des vacuoles parasitophores par rapport aux cellules non infectées où ils sont diffus (Walker *et al.*, 2008).

Le blocage du cycle cellulaire pourrait permettre une multiplication adéquate du parasite comme c'est le cas pour le VIH, où l'arrêt en phase G2/M est associé à une meilleure réplication virale.

Enfin, cet effet pourrait retarder ou empêcher l'apoptose des cellules infectées et ainsi permettre la multiplication parasitaire dans chaque cellule infectée sans lyse prématurée de la cellule. Une des voies par laquelle l'apoptose est induite implique l'activation prématurée de Cdk1 (déphosphorylation) (Shi *et al.*, 1994, Chen *et al.*, 1995). L'expression de la kinase Wee

prévient l'induction de l'apoptose par cette voie. Par analogie, une protéine parasitaire pourrait de façon similaire bloquer l'apoptose en prévenant l'activation de Cdk1. Un des mécanismes par lesquels les lymphocytes T cytotoxiques détruisent les cellules-cibles infectées est l'induction de l'apoptose, induite, au moins en partie, par les granzymes qui activent Cdk1 (Shi *et al.*, 1994). De plus, il a été montré que les lymphocytes T cytotoxiques tueraient moins efficacement les cellules qui sont arrêtées dans la progression du cycle cellulaire que celles qui prolifèrent (Nishioka et Welsh, 1994). C'est pourquoi en bloquant l'activation prématurée de Cdk1, le parasite pourrait augmenter la résistance des cellules infectées à l'apoptose médiée par les lymphocytes T cytotoxiques. Ceci ne nécessite pas obligatoirement un arrêt des cellules en phase G2, mais seulement la prévention de l'activation de Cdk1. En effet, toutes les cellules infectées ne sont pas arrêtées en phase G2 du cycle cellulaire, et de ce fait, ces cellules non encore arrêtées mais dans lesquelles Cdk1 serait inactivée pourraient être protégées de l'apoptose.

Nos résultats suggèrent que l'infection par *T. gondii* induit une dérégulation du cycle cellulaire de la cellule-hôte infectée, ce qui semble être une exigence pour la prolifération du parasite durant sa phase de multiplication intracellulaire.

II. UHRF1 est requis pour la prolifération intracellulaire de *T. gondii*

Précédemment, nous avons montré que l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire était modulée lors de l'infection (Blader *et al.*, 2001, Molestina *et al.*, 2005) et que *T. gondii* induisait une dérégulation du cycle cellulaire de la cellule-hôte infectée (Brunet *et al.*, 2008). UHRF1 est un facteur de transcription impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et son absence dans les cellules infectées empêche la progression du cycle cellulaire de ces cellules en phase G2/M. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'UHRF1 pourrait être important pour la prolifération intracellulaire de *T. gondii*.

Nous avons démontré que l'infection induit une augmentation d'expression UHRF1. De plus, en supprimant l'expression d'UHRF1 par l'utilisation de SiRNA-UHRF1, nous avons observé que la prolifération parasitaire était sévèrement réduite. Les capacités d'invasion du parasite ne semblent pas altérées. De plus, cette inhibition de prolifération n'induit pas pour autant l'apparition de bradyzoïtes et donc le développement de kystes, ce qui fait d'UHRF1

une cible thérapeutique intéressante. Toutefois, les expériences n'ont été réalisées qu'avec la souche virulente RH de type I dont les capacités d'enkystement sont limitées et ceci devra être confirmé en utilisant des souches kystogènes. Nous avons également démontré que l'infection par *T. gondii* entraînait une activation du promoteur du gène *uhrf1* dans les cellules infectées par *T. gondii* (Figure 45).

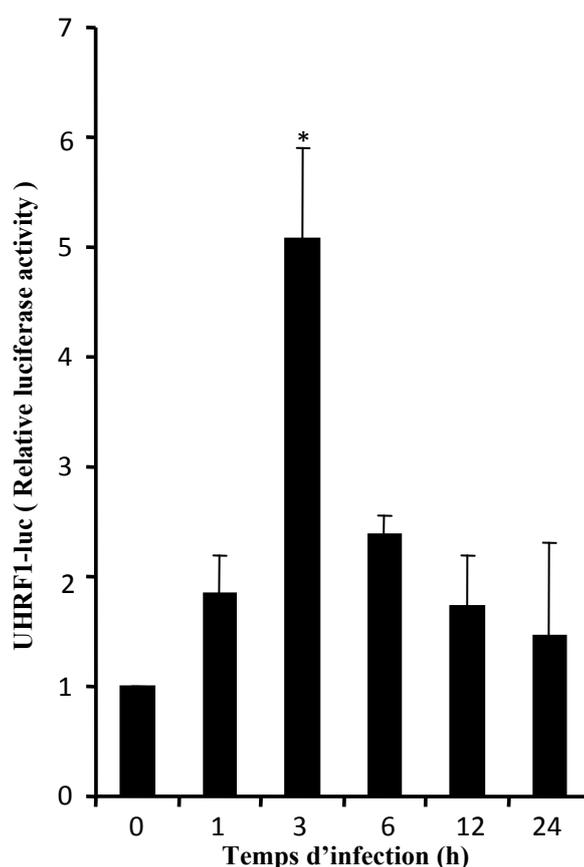


Figure 45 : Activité du promoteur d'*uhrf1* dans les cellules BeWo infectées par *T. gondii*. Les cellules BeWo sont transfectées pendant 24 heures (2µg / puits) avec du FuGen par le plasmide pGL3-UHRF1-Luc puis infectées par *T. gondii* durant 0, 1, 3, 6, 12 et 24 heures. L'activité du promoteur du gène *uhrf1* est déterminée par la mesure de l'activité luciférase (* 0,01 ≤ p < 0,05).

Les mécanismes conduisant à l'activation d'UHRF1 dans les cellules infectées restent à élucider. Plusieurs facteurs de transcription de la cellule-hôte, y compris HIF1, STAT3, STAT6, et, dans certains cas, NF-κB sont activés dans les cellules-hôtes infectées par *Toxoplasma*. Une autre hypothèse expliquant l'activation du gène *uhrf1* pour des temps précoces d'infection et la surexpression de la protéine pour des temps plus longs pourrait impliquer des facteurs augmentant la demi-vie de cette protéine. L'infection par *T.gondii* pourrait empêcher la dégradation d'UHRF1 en entraînant des modifications post-

traductionnelles d'UHRF1, ou en inhibant sa dégradation par le protéasome. L'activation de certains de ces facteurs de transcription est supposée être régulée par des facteurs parasitaires localisés dans une grande variété d'organites parasitaires, y compris les rhoptries, les micronèmes et les granules denses. Deux protéines de rhoptries ROP16 et PP2C sont les seules protéines parasitaires connues à l'heure actuelle pour être présentes très tôt après l'infection dans le noyau de la cellule-hôte et pourraient de ce fait interférer avec les voies de signalisation impliquant UHRF1 comme c'est le cas pour STAT (Yamamoto *et al.*, 2009). *Toxoplasma* peut aussi moduler positivement ou négativement NF- κ B. La régulation de NF- κ B par *Toxoplasma* et l'activation d'UHRF1 sont-elles liées ? Ce point reste à approfondir.

Plusieurs facteurs de transcription sont connus pour être modulés par *T. gondii* mais seul HIF1 est indispensable pour la prolifération parasitaire en condition d'hypoxie. Il pourrait être impliqué dans la croissance parasitaire de par les gènes qu'il régule et qui sont impliqués dans la survie cellulaire, le métabolisme du fer et du glucose et la prolifération cellulaire.

Dans cette étude, nous avons montré qu'UHRF1 était un nouveau facteur de transcription de l'hôte dont l'expression était modulée par l'infection parasitaire et qui était indispensable à la multiplication de *T. gondii* par un mécanisme inconnu à l'heure actuelle. Plusieurs hypothèses peuvent être émises : premièrement, UHRF1 étant un facteur de transcription, il est plus susceptible de favoriser la croissance du parasite par la modulation de l'expression de certains gènes-cibles comme ceux impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ou l'apoptose. L'étude des gènes-cibles d'UHRF1 dans les cellules infectées constituera un axe de recherche de nos futurs travaux afin d'identifier ceux qui sont importants pour la croissance parasitaire. Il est à noter qu'UHRF1 se lie au promoteur du gène *p21* et inhibe son activité (Kim *et al.*, 2009). Dans le cas de l'infection par *T. gondii*, la sur-expression d'UHRF1 pourrait participer à l'absence d'expression de *p21* active observée. Deuxièmement, UHRF1 étant associé à la régulation du cycle cellulaire et notamment au contrôle du passage en phase S, il pourrait être impliqué dans la favorisation de ce passage dans les cellules infectées. *T. gondii* prolifère à l'intérieur d'une vacuole parasitophore qui s'élargit au cours du temps et peut éventuellement occuper la totalité du cytoplasme de la cellule-hôte. L'induction et le maintien d'une réponse proliférative dans les cellules infectées par *T. gondii*, permettrait de satisfaire aux exigences de croissance intracellulaire du parasite et notamment que la cellule-hôte puisse accueillir l'accroissement de la vacuole parasitophore au sein de son cytoplasme pendant plusieurs jours ou plusieurs mois. Pour que

cet environnement ne soit pas menacé par la division cellulaire et le déclenchement de la mitose, *T. gondii* induit également un arrêt du cycle cellulaire en phase G2. La réponse proliférative accrue dans les cellules infectées pourrait également expliquer le fait que les cellules infectées arborent plus de mitochondries et de réticulum endoplasmique que les cellules non infectées (Walker *et al.*, 2008). En effet, le nombre de mitochondries par cellule est régulé par l'activité cellulaire, et la réplication de l'ADN mitochondrial est en partie réalisée pendant la phase S du cycle cellulaire.

Enfin, UHRF1 est un facteur-clé des modifications épigénétiques, reliant la méthylation de l'ADN et la modification des histones et ainsi est impliqué dans les phénomènes de « gene silencing ». La surexpression d'UHRF1 dans les cellules infectées pourrait être utilisée par le parasite pour moduler le génome de la cellule-hôte. Les expériences futures nous permettront de déterminer la nature des gènes contrôlés par UHRF1 au cours de l'infection par *T. gondii*. Ces expériences sont importantes car UHRF1 représente une cible thérapeutique attractive car il pourrait réguler des gènes importants pour la croissance parasitaire. Il est impliqué dans certains cancers et les efforts réalisés dans la recherche de thérapies anticancéreuses ciblant UHRF1 pourraient être appliquées dans des thérapies anti-toxoplasmiques.

Article I: *Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation.

Julie Brunet¹, Alexander W. Pfaff¹, Ahmed Abidi¹, Motoko Unoki² Yusuke Nakamura³, Marie Guinard¹, Jean-Paul Klein¹, Ermanno Candolfi¹ and Marc Mousli^{1*}

¹Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg, UPRES E.A. 3950 Interactions Cellulaires et Moléculaires Hôte-Parasite, Faculté de Médecine. Université Louis Pasteur, 67000 Strasbourg, France. ²Laboratory of Human Carcinogenesis, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, NIH, Bethesda, Maryland 20892-4258, USA. ³Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

*Corresponding author:

Marc Mousli, Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg, 3 rue Koeberlé,
67000 Strasbourg, France, Tel (33) 390 24 36 88; Fax (33) 390 24 36 93; E-Mail:
Marc.Mousli@medecine.u-strasbg.fr

Résumé de la publication

T. gondii est un parasite intracellulaire qui persiste dans certains organes immunologiquement privilégiés comme le cerveau ou l'œil, où l'inflammation est limitée et la destruction tissulaire liée à la cytolysse est réduite afin de préserver l'intégrité fonctionnelle de l'organe infecté (Black and Boothroyd, 2000). Il est généralement cliniquement quiescent mais peut parfois être réactivé chez le sidéen ou lors d'une toxoplasmose congénitale. Dans la vacuole parasitophore, le parasite redistribue les organites intracellulaires, module la transcription, interfère avec de nombreux mécanismes physiologiques cellulaires (Coppens and Joiner, 2001). L'identification de nouvelles voies de signalisation ou de nouveaux facteurs de transcription modulés par le parasite permettrait d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans ce contexte, nous avons voulu savoir si *Toxoplasma* pouvait influencer le cycle cellulaire des cellules-hôtes infectées. Dans les cellules trophoblastiques BeWo, nous

avons observé un arrêt du cycle cellulaire de la cellule-hôte infectée par *T. gondii*. Cet arrêt de la prolifération n'est pas spécifique des cellules trophoblastiques puisque les fibroblastes NHDF (Normal Human Dermal Fibroblasts) voient également leur prolifération s'arrêter lorsqu'ils sont infectés. L'arrêt du cycle cellulaire est effectué en phase G2/M. Il est intéressant de constater que le parasite a également la capacité de provoquer le passage de G0/G1 à S puis G2/M de cellules NHDF à confluence ou de cellules trophoblastiques traitées à la L-Mimosine, molécule qui bloque le cycle cellulaire en phase G1. Sur le plan moléculaire, de nombreuses perturbations des protéines impliquées dans la régulation du cycle sont observées. Nous constatons une diminution rapide du pool de cycline B dans les cellules infectées, l'origine de cette baisse restant à explorer. Si l'expression de la Cdk1 totale reste inchangée, l'expression de sa forme inactive Thr14/Tyr15-phosphorylée augmente après 3 h d'infection puis diminue progressivement parallèlement à la baisse de la cycline B, laissant la forme active croître proportionnellement, sans pour autant surmonter l'arrêt du cycle en phase G2/M. En même temps, la p21, inhibant le cycle cellulaire en agissant sur le complexe cycline B-Cdk1, voit sa forme hyper-phosphorylée active augmenter. p53, quant à elle, augmente jusqu'à 6h puis décroît, tandis qu'un facteur de transcription UHRF1, impliqué aussi dans la régulation du cycle cellulaire, augmente de façon régulière au cours de l'infection. Ainsi, UHRF1, sous le contrôle du parasite, assure le passage G1/S puis contribue au blocage final des cellules en G2/M. Afin d'apprécier l'implication d'UHRF1 dans la croissance intracellulaire du parasite, nous avons inhibé UHRF1 en transfectant avec des SiRNA d'UHRF1 des cellules infectées. Ceci s'est traduit par une baisse de 50% de la croissance parasitaire. Avec HIF1 (Spear *et al.*, 2006), il s'agit du deuxième facteur de transcription connu pour être impliqué dans la croissance parasitaire, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques par l'investigation des voies ou gènes contrôlés par ce facteur de transcription.

Partie 1 : Rôle d' UHRF1 dans la régulation du cycle cellulaire des cellules-hôtes infectées et son influence dans la prolifération intracellulaire de *T. gondii*

Partie 2 : Etude des mécanismes de régulation du gène de la *cycline B* dans les cellules infectées et altérations épigénétiques induites par l'infection

Partie 3 : Modulation de l'expression d'UHRF1 dans les cellules infectées par *T. gondii*

PARTIE II : Mécanismes de régulation du gène de la *cycline B* dans les cellules infectées et altérations épigénétiques induites par l'infection.

Le parasite a développé différentes stratégies pour promouvoir sa survie et sa prolifération intracellulaire. L'une d'entre elle est d'induire une dérégulation du cycle cellulaire de la cellule-hôte ainsi que de certains régulateurs du cycle cellulaire. C'est le cas de la cycline B et du facteur de transcription UHRF1. La deuxième partie de ce travail porte sur l'étude de la régulation de la cycline B lors de l'infection par *T. gondii* et de l'implication d'UHRF1 dans la modulation de l'expression de cette cycline. UHRF1 étant un élément central dans les interactions épigénétiques, nous nous sommes également intéressés aux altérations épigénétiques induites par l'infection et impliquées dans la modulation du cycle cellulaire des cellules-hôtes infectées.

I. Résultats

I.1. *T. gondii* exploite UHRF1 pour supprimer l'expression de la cycline B

Les résultats acquis montrent que l'infection par *T. gondii* conduit à un arrêt du cycle cellulaire de la cellule-hôte en phase G2 et à l'inhibition de la prolifération des cellules-hôtes. Nous avons constaté une rapide diminution de la cycline B dans les cellules infectées couplée à l'augmentation d'expression d'UHRF1.

L'expression des protéines UHRF1 et cycline B a été analysée par Western blot à partir d'extraits cellulaires infectés par la souche RH de type I avec un rapport 1/1. Le dosage de l'ARNm codant pour UHRF1 et la cycline B, par RT-PCR quantitative, montre une augmentation significative de l'expression de l'ARNm UHRF1 jusqu'à 3 heures d'infection et une diminution du message de la cycline B au cours de l'infection. Cette diminution est parallèle à celle de la protéine de la cycline B alors que l'expression d'UHRF1 augmente régulièrement pendant l'infection (Figure 46).

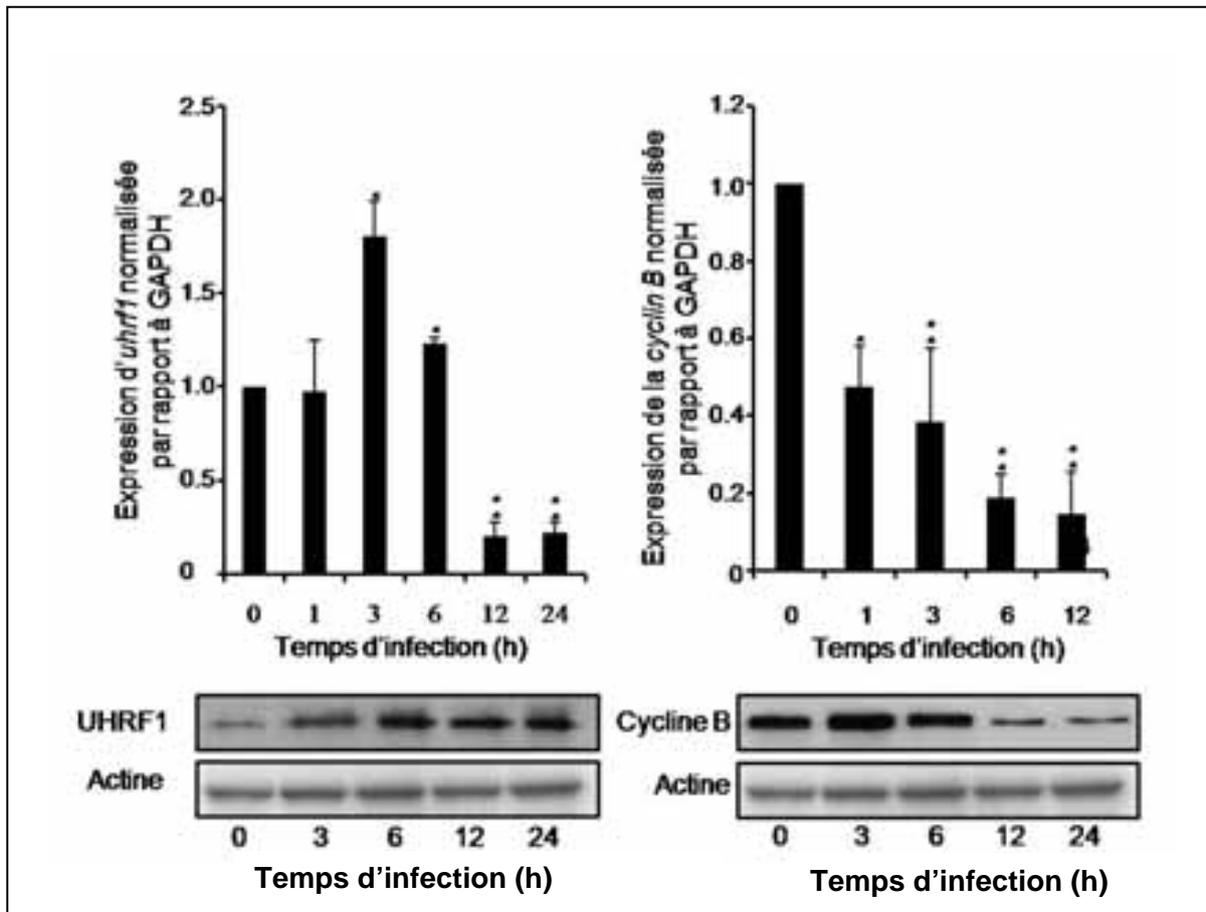


Figure 46 : Mesure de l'expression des protéines et des ARNm d'UHRF1 et de la cycline B dans les cellules BeWo infectées par *T. gondii*. Les cellules BeWo sont infectées pendant 0, 3, 6, 12 et 24 heures par *T. gondii*. L'analyse des variations de protéines est effectuée par Western Blot et celle des ARNm par RT-PCR quantitative. Les données représentent la moyenne et les écarts-types de 3 expériences distinctes (* $p < 0.05$ et ** $p < 0.02$).

Nous nous sommes intéressés à la possible implication d'UHRF1 dans la régulation de la cycline B. En effet, le promoteur du gène de la *cycline B* possède de nombreux sites de liaison pour UHRF1. Par immunoprécipitation de la chromatine, nous avons étudié la liaison d'UHRF1 au promoteur de la *cycline B* dans les cellules infectées. Nous observons que l'infection par *T. gondii* accroît la liaison d'UHRF1 au promoteur de la *cycline B* (Figure 47).

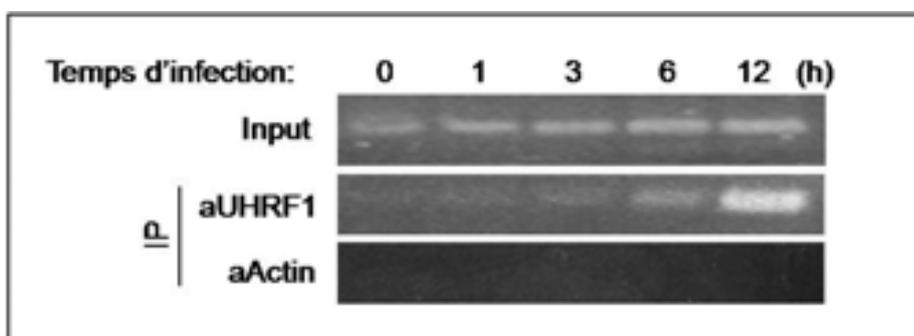


Figure 47 : Liaison d'UHRF1 sur le promoteur du gène de la *cycline B*. Les cellules BeWo sont infectées par *T. gondii* durant 0, 1, 3, 6 et 12 heures. La liaison d'UHRF1 au promoteur de la *cycline B* est analysée par immunoprécipitation de la chromatine.

Nous avons ensuite supprimé l'expression d'UHRF1 en utilisant des SiRNA-UHRF1 et observé l'expression de la cycline B par Western blot. Les cellules transfectées avec le plasmide SiRNA-EGFP sont utilisées comme contrôle. Contrairement au groupe contrôle où l'expression de la cycline B diminue en présence d'UHRF1 et avec l'infection, l'expression de la cycline B augmente dans les cellules transfectées avec les SiRNA-UHRF1 (Figure 48).

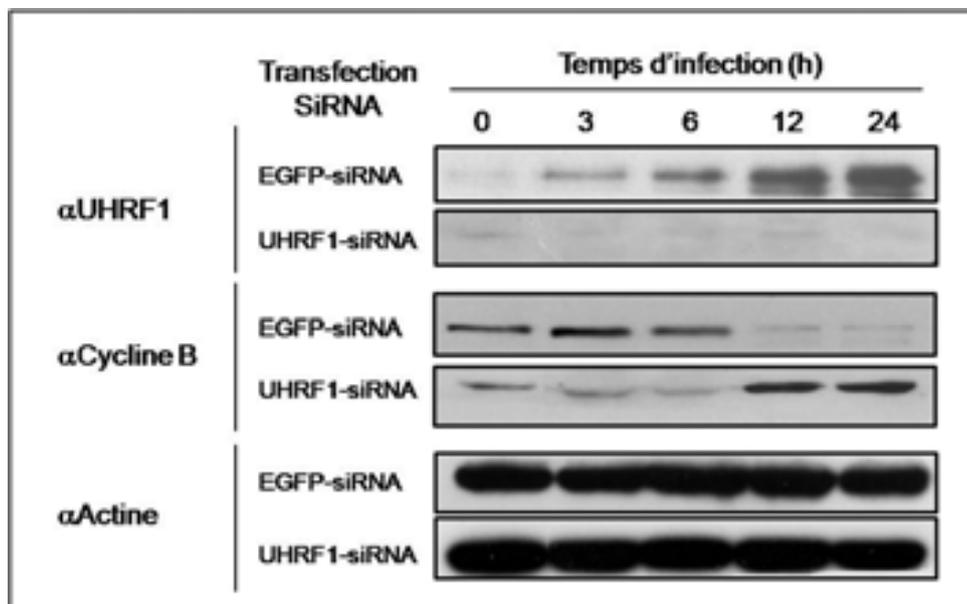


Figure 48 : Mesure de l'expression de la cycline B dans les cellules BeWo infectées par *T. gondii* en l'absence d'UHRF1. Les cellules BeWo sont transfectées avec soit SiRNA-UHRF1, soit SiRNA-EGFP pendant 24 heures puis infectées pendant 0, 3, 6, 12 et 24 heures par *T. gondii*. L'analyse des variations protéiques est effectuée par Western Blot avec des anticorps anti-UHRF1 et anti-cycline B, l'actine servant de standard.

Nos résultats indiquent que la *cycline B* est un gène contrôlé par UHRF1 lors de l'infection par *T. gondii* et qu'UHRF1 régule négativement le gène de la *cycline B* entraînant un arrêt du cycle cellulaire des cellules infectées en phase G2.

I.2. Altérations épigénétiques induites par l'infection

UHRF1 est un facteur de transcription capable de se lier aux promoteurs des gènes qu'il régule sur les CCAAT box (Hopfner *et al.*, 2000). Cette liaison est régulée par phosphorylation (Trotzier *et al.*, 2004). Cependant, UHRF1 présente aussi une affinité pour les CpG méthylés. Le promoteur du gène de la cycline B présente plusieurs CCAAT box et plusieurs îlots CpGs. A côté de sa capacité à se lier à l'ADN, UHRF1 joue un rôle important dans le remodelage de la chromatine par des interactions avec les enzymes modifiant les histones.

La méthylation est une marque épigénétique importante qui est associée à une faible expression ou à une inactivation des gènes. Elle est réalisée par des enzymes appelées DNA methyltransferases (Dnmt). Dnmt1 est la principale enzyme responsable du maintien de la méthylation après la réplication. Dnmt3a et 3b sont responsables de la méthylation « *de novo* ». Certains virus sont capables d'induire une méthylation de certains gènes-hôtes en particulier pour supprimer la réponse immunitaire de l'hôte. Le virus de l'hépatite B et notamment la protéine HBx (hepatitis B virus X protein) est capable d'interagir avec Dnmt3a pour moduler l'expression de certains gènes (Zheng *et al.*, 2009).

Suivant notre hypothèse, la surexpression d'UHRF1 dans les cellules infectées pourrait être utilisée par le parasite pour moduler le génome de la cellule-hôte infectée *via* des modifications épigénétiques.

Afin d'élucider les mécanismes permettant à UHRF1 de se lier au promoteur du gène de la *cycline B*, nous avons étudié, dans un premier temps, sa possible liaison aux CpG méthylés et dans un deuxième temps, sa liaison aux CCAAT du promoteur du gène de la *cycline B*

I.2.1. Modulation de l'expression des DNA methyltransferases lors de l'infection

Pour étudier l'effet de l'infection sur l'expression des Dnmts, nous avons analysé leurs profils d'expression lors de l'infection par RT-PCR quantitative (Figure 49). Nous observons que l'expression des ARNm des Dnmts augmente de façon séquentielle lors de l'infection. Alors que Dnmt3a est induite très tôt après l'infection, Dnmt1 et 3b sont induites plus tardivement. L'infection induit l'expression des Dnmts et pourrait également augmenter leur activité. Ceci pourra être vérifié en mesurant l'activité des promoteurs de ces différentes enzymes couplés à la luciférase.

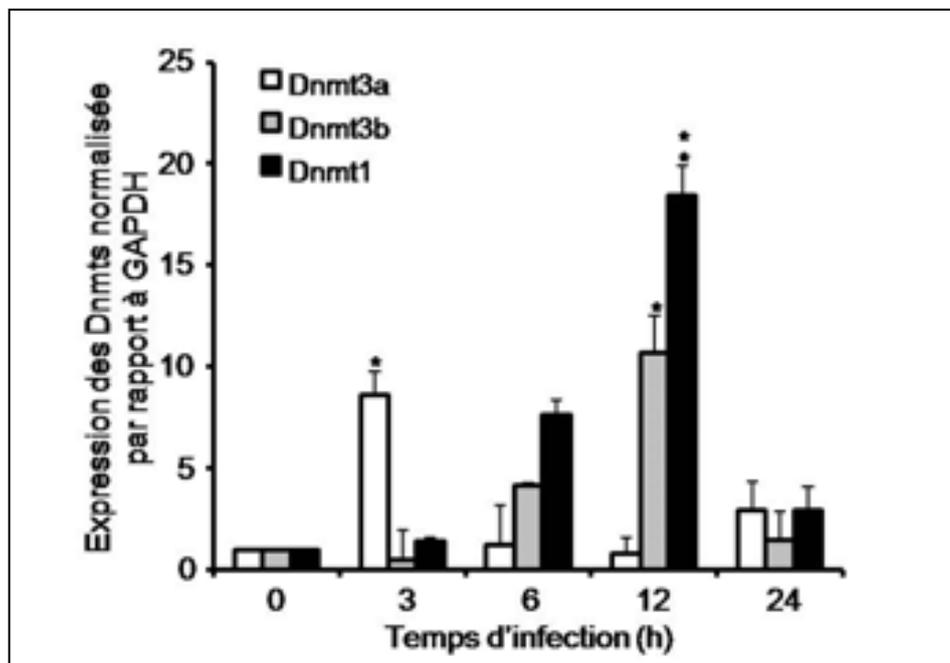


Figure 49 : Mesure de l'expression des ARNm des Dnmts dans les cellules BeWo infectées par *T. gondii*. Les cellules BeWo sont infectées pendant 0, 3, 6, 12 et 24 heures par *T. gondii*. L'analyse des variations des ARNm par RT-PCR quantitative. Les données représentent la moyenne et les écarts-types de 3 expériences distinctes (* $p < 0.05$ et ** $p < 0.02$).

L'infection induit une augmentation d'expression séquentielle des Dnmts qui, après 24 heures d'infection pour Dnmt1 et 3b et après 3 heures d'infection pour Dnmt3a, voient leur expression régulée négativement. L'expression extensive de Dnmt1 entraîne une mortalité embryonnaire chez la souris (Biniszkiwicz *et al.*, 2002). L'expression de Dnmt3a a été rapportée comme diminuant la viabilité chez la drosophile (Lyko *et al.*, 1999), ceci suggère que la méthylation *de novo* non spécifique par une activité excessive de ces enzymes pourrait

être néfaste dans ce modèle animal. Une augmentation trop importante et continue de l'activité des Dnmts pourrait entraîner une apoptose des cellules, alors qu'une régulation fine et appropriée de l'activité des Dnmts par le parasite conduisant à l'hyperméthylation de certains gènes semble plus appropriée. De plus p53 régule en partie l'expression des Dnmts (Park *et al.*, 2005). La transcription de Dnmt1 est réprimée par p53 (Peterson *et al.*, 2003), or dans les cellules infectées, l'expression de p53 diminue après 6 heures d'infection. Ainsi, l'inhibition de p53 dans les cellules infectées pourrait expliquer en partie l'induction de Dnmt1.

I.2.2. Induction d'une hyperméthylation du génome de la cellule-hôte par *T. gondii*

Pour déterminer si les altérations dans l'expression des Dnmts lors de l'infection pouvaient influencer la méthylation globale du génome de la cellule-hôte infectée, nous avons caractérisé la méthylation de l'ADN par la technique du bisulfite. Le traitement au bisulfite des CpG non méthylés convertit la cytosine en uracile, tandis que les cytosines méthylées ne sont pas converties. Nous observons que la proportion d'ADN méthylé augmente avec l'infection alors que la proportion d'ADN non méthylé diminue avec l'infection (Figure 50).

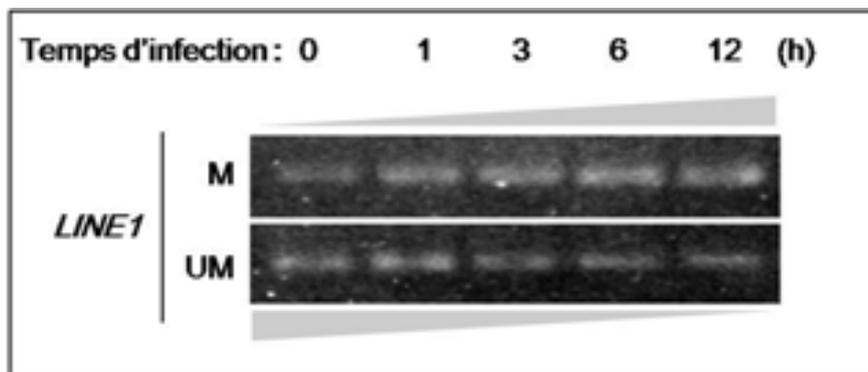


Figure 50 : Méthylation de l'ADN des cellules BeWo infectées par *T. gondii*. Les cellules BeWo sont infectées par *T. gondii* pendant 0, 1, 3, 6 et 12 heures avec un rapport d'infection de 1/1. L'ADN est extrait et traité au bisulfite. La méthylation de la séquence LINE1 est analysée par PCR avec des primers spécifiques des séquences méthylées (M) et non méthylées (NM).

L'infection par *T. gondii* induit donc une hyperméthylation d'une partie du génome des cellules-hôtes.

Nous avons montré que *T. gondii* pouvait réguler certaines modifications épigénétiques et notamment la méthylation en augmentant l'expression des Dnmt3a et 3b dans les cellules

infectées pour faciliter l'hyperméthylation du promoteur de certains gènes *via* la méthylation *de novo*. Nos prochaines études se focaliseront sur l'étude des îlots CpG hyperméthylés lors de l'infection afin d'identifier les gènes cibles des modifications épigénétiques médiées par la parasite. Puisque UHRF1 se lie à l'ADN méthylé, il pourrait donc être l'intermédiaire permettant au parasite de recruter Dnmt3a et 3b aux promoteurs de certains gènes spécifiques. Des expériences d'immunoprécipitations devront être réalisées pour étudier la possible participation des ces deux enzymes au complexe recruté par UHRF1 et comprenant HDAC1, Dnmt1 ou G9a notamment.

I.2.3. Altérations épigénétiques impliquées dans la régulation du cycle cellulaire des cellules infectées par *T. gondii*

L'hyperméthylation de l'ADN de la cellule-hôte pourrait faciliter la liaison d'UHRF1 aux promoteurs des gènes qu'il régule et notamment, dans le cas de l'infection par *T. gondii*, celui de la *cycline B*. Notre hypothèse étant que la surexpression des DnmTs pourrait induire une hyperméthylation *de novo* du promoteur du gène de la *cycline B*. C'est pourquoi nous avons séquencé le promoteur du gène de la *cycline B* grâce à la méthode bisulfite et observé le statut de méthylation de ce promoteur lors de l'infection.

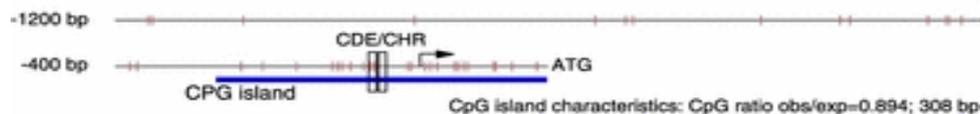


Figure 51 : Îlots CpG du promoteur de la *cycline B2*. Les lignes rouges représentent les CpG et la ligne bleue les îlots CpG identifiés (Tschöp et Engeland 2007).

Le statut de méthylation de ces sites ne varie pas au cours de l'infection par *T. gondii*. Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence d'îlots CpG méthylés sur le promoteur de la *cycline B* après l'infection.

Une hypothèse est que la méthylation pourrait exercer son rôle sur d'autres sites que ceux que nous avons analysés. Irizarry *et al.*, (2009) ont montré que la plupart des altérations de la méthylation observée dans le cancer du colon ne résidaient pas dans le promoteur des gènes, ni dans les îlots CpG mais dans des séquences éloignées de 2 kb qu'ils ont appelées « island shores ». Il serait donc intéressant d'analyser le statut de méthylation des « islands shores »

dans le gène de la *cycline B* lors de l'infection. La méthylation pourrait également avoir un effet indirect sur le gène de la *cycline B* impliquant des changements dans l'expression de facteurs régulant ce gène.

I.2.4. Liaison d'UHRF1 aux CCAAT box du promoteur du gène de la *cycline B*

UHRF1 se lie aux régions promotrices de certains gènes méthylés tels que p16, p14, p21 et régule leur expression. UHRF1 peut également se lier aux CCAAT box dans la région promotrice de la Topo II α . La liaison d'UHRF1 au promoteur de la *cycline B* pourrait faire intervenir les CCAAT box situées sur le promoteur de la *cycline B* et non plus sa méthylation.

Nous avons réalisé une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine sur des cellules transfectées avec des plasmides contenant le promoteur de la *cycline B* délété pour les CCAAT box ou non (Figure 52).

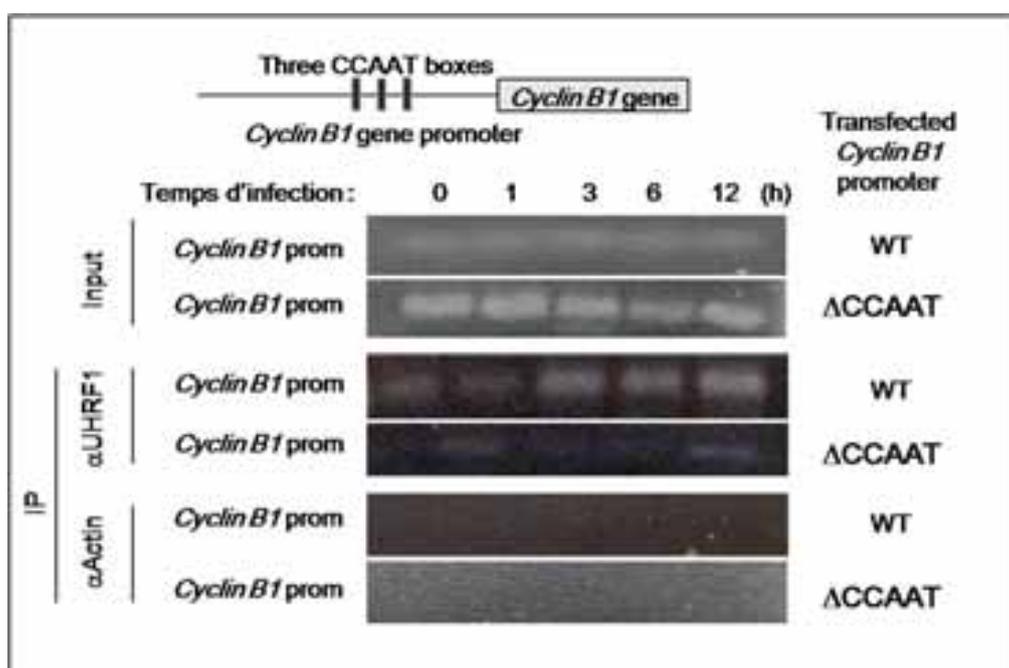


Figure 52 : Liaison d'UHRF1 au promoteur de la *cycline B* dans les cellules transfectées avec les plasmides Cycline B WT ou Δ CCAAT. Les cellules BeWo sont transfectées puis sont infectées par *T. gondii* durant 0, 1, 3, 6 et 12 heures. La liaison d'UHRF1 au promoteur de la *cycline B* est analysée par immunoprécipitation de la chromatine.

UHRF1 présente une plus forte affinité pour le promoteur complet de la *cycline B* que pour le promoteur délété des CCAAT box. Ceci suggère une liaison d'UHRF1 aux CCAAT box du promoteur de la *cycline B* dans les cellules infectées.

Cette liaison d'UHRF1 aux CCAAT box du promoteur de la *cycline B* pourrait induire le recrutement de protéines associées à l'épigénétique comme les Dnmts ou les HDAC ou G9a. UHRF1, ancré au promoteur de la *cycline B*, pourrait également recruter certaines enzymes impliquées dans la modification des histones sur le promoteur du gène de la *cycline B*, induisant ainsi un remodelage de la chromatine et une inactivation de ce gène (Figure 53).

Cette hypothèse pourra être vérifiée en utilisant des inhibiteurs des HDAC (trichostatin) ou de la méthyltransférase G9a (BIX-01294 : diazépín-quinazolin-amine derivative) et en analysant leurs effets sur l'expression de la *cycline B* dans les cellules infectées.

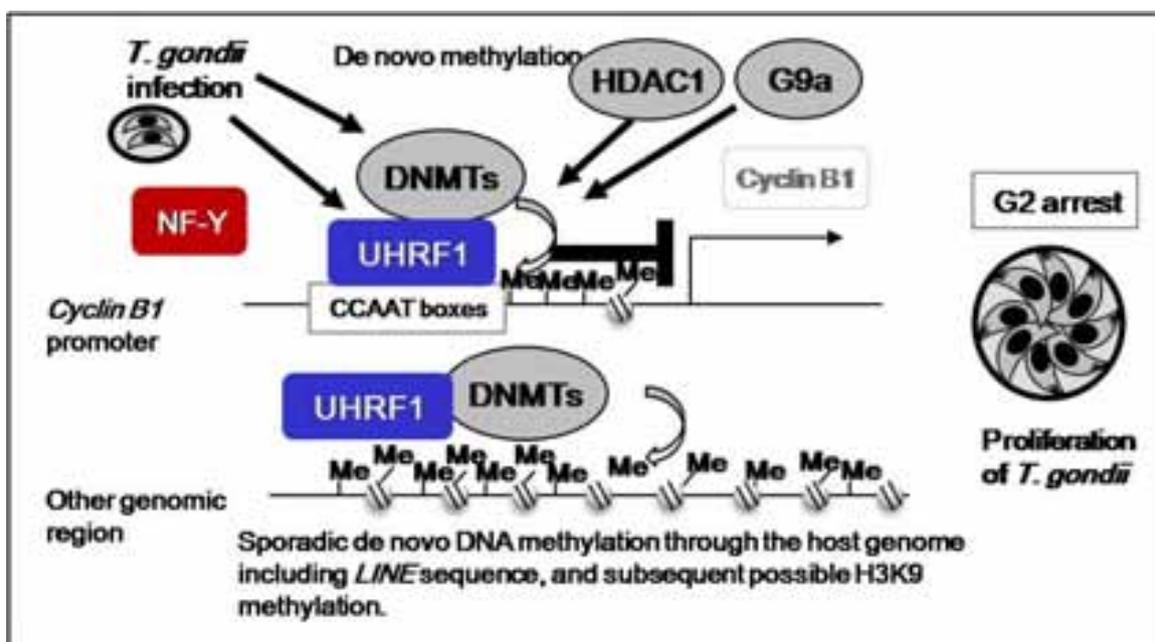


Figure 53 : Mécanismes possibles d'inactivation du gène de la *cycline B* dans les cellules infectées. *T. gondii* induit une augmentation d'expression d'UHRF1 et des Dnmts. UHRF1 se lie aux CCAAT box sur le promoteur du gène de la *cycline B* de façon directe ou indirecte, recrute les Dnmts qui méthylent le promoteur. UHRF1 recrute également HDAC1 et G9a, ce qui favorise la formation de l'hétérochromatine et la suppression de l'expression du gène de la *cycline B*. Ceci n'est pas restreint à la *cycline B* et pourrait concerner d'autres gènes (Unoki *et al.*, 2009).

UHRF1, pour favoriser la prolifération parasitaire, pourrait recruter un complexe capable de modifier la chromatine en établissant un environnement hétérochromatinique aux promoteurs de certains gènes importants pour sa survie et sa prolifération intracellulaire.

II. Conclusion

Dans cette deuxième partie nous avons montré que la parasite exploitait UHRF1 pour supprimer l'expression de la cycline B dans les cellules infectées et induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G2, favorable à la prolifération parasitaire. Nous avons également démontré que la parasite manipule la machinerie épigénétique pour inactiver certains gènes-hôtes. Il induit l'expression de Dnmts et une hyperméthylation du génome de la cellule-hôte ceci pouvant entraîner l'inactivation de certains gènes dont la nature reste à déterminer. La suppression de l'expression de la cycline B impliquerait préférentiellement la liaison d'UHRF1 sur les CCAAT box du gène de la *cycline B* et l'inactivation pourrait du gène se faire après recrutement d'HDAC1 et de G9a par UHRF1. UHRF1 pourrait également être impliqué dans la dégradation de la cycline B *via* le protéasome puisqu'il appartient à la famille des E3 ligases.

Récemment, Leng *et al.*, (2009) ont montré que *T. gondii* était capable d'interférer avec la transcription des gènes de la cellule-hôte en ciblant le remodelage de la chromatine entourant le promoteur du TNF- α , ceci en inhibant la phosphorylation Ser10 et l'acétylation Lys9/14 de l'histone H3 au niveau du promoteur du TNF- α . On ne sait pas encore comment *Toxoplasma* influence la modification des histones mais la capacité du parasite à exploiter UHRF1 pourrait expliquer le ciblage du remodelage de la chromatine par le parasite et plus généralement les modifications épigénétiques ; ceci pour assurer sa prolifération et sa survie dans la cellule-hôte. A l'heure actuelle, *T. gondii* est le premier exemple de parasite connu pour interférer avec les modifications épigénétiques de la cellule-hôte. Cette étude, associée à la notre identifie la structure de la chromatine comme une nouvelle stratégie utilisée par *T. gondii* pour manipuler les voies de signalisation de la cellule-hôte.

Nous n'avons pas mis en évidence de méthylation du promoteur du gène de la *cycline B* dans les cellules-infectées, cependant, *T. gondii* induit une hyperméthylation du génome de la cellule-hôte. Il nous paraît donc intéressant de poursuivre cette étude par l'analyse du statut de méthylation des gènes lors de l'infection. Ceci pourra être réalisé par microarrays ou par le système le SOLiD™ System (Applied System) qui permet l'analyse quantitative de la méthylation de l'ADN après conversion au bisulfite .

UHRF1 est connu pour réguler pRB, la TopoII et la cycline B, mais il est fort probable que son spectre d'action soit beaucoup plus large. UHRF1 pourrait être un excellent outil de contrôle des gènes de la cellule-hôte par le parasite. Il nous faudra donc déterminer la nature

des gènes contrôlés par ce facteur de transcription au cours d'une infection parasitaire en comparaison à ce qui existe dans des cellules non infectées. Pour ce faire, nous allons utiliser l'approche suivante : détermination de la nature des promoteurs liant UHRF1 par « Chromatin ImmunoPrecipitation on Chip » : nous utiliserons des anticorps anti-UHRF1 qui précipitent UHRF1 et les fragments d'ADN qui lui sont liés. Ces fragments seront hybridés sur une puce à ADN contenant des sondes de capture comportant un large spectre de promoteurs de gènes humains (Agilent CHIP-on-chip, Agilent Technologies). Nous confirmerons ensuite les promoteurs d'intérêt par RT-PCR.

Partie 1 : Rôle d' UHRF1 dans la régulation du cycle cellulaire des cellules-hôtes infectées et son influence dans la prolifération intracellulaire de *T. gondii*

Partie 2 : Etude des mécanismes de régulation du gène de la *cycline B* dans les cellules infectées et altérations épigénétiques induites par l'infection

Partie 3 : Modulation de l'expression d'UHRF1 dans les cellules infectées par *T. gondii*

PARTIE III : Modulation de l'expression d'UHRF1 dans les cellules infectées par *T. gondii*

Le facteur de transcription UHRF1 est activé lors de l'infection par *T. gondii* avec pour conséquences un effet sur la prolifération cellulaire et sur la modulation du génome de la cellule-hôte. Dans cette troisième partie de ma thèse, nous nous sommes attachés à caractériser les mécanismes responsables de cette activation.

NF- κ B est un autre facteur de transcription dont l'activité est modulée au cours de l'infection (Molestina *et al.*, 2003). *T. gondii* entraîne une translocation nucléaire de NF- κ B ainsi que son activation, conduisant à une up-régulation de gènes-cibles ayant une fonction anti-apoptotique, pro-inflammatoire ou dans la survie cellulaire. NF- κ B régule notamment l'expression de gènes contrôlant des cytokines pro-inflammatoires (IL-12, TNF α) (Baeuerle *et al.*, 1994). Il induit également l'expression de gènes pouvant inhiber l'apoptose ; c'est le cas de c-IAP (cellular Inhibitors of Apoptosis), des membres de la famille Bcl-2 et TRAF1 et 2 (TNF-Receptor-Associated Factors 1 and 2) (Karin *et al.*, 2002). En analysant le promoteur du gène *uhrfl*, nous avons identifié 9 sites de liaison potentiels de NF- κ B (Figure 54). UHRF1 pourrait donc être un des gènes régulés par NF- κ B.

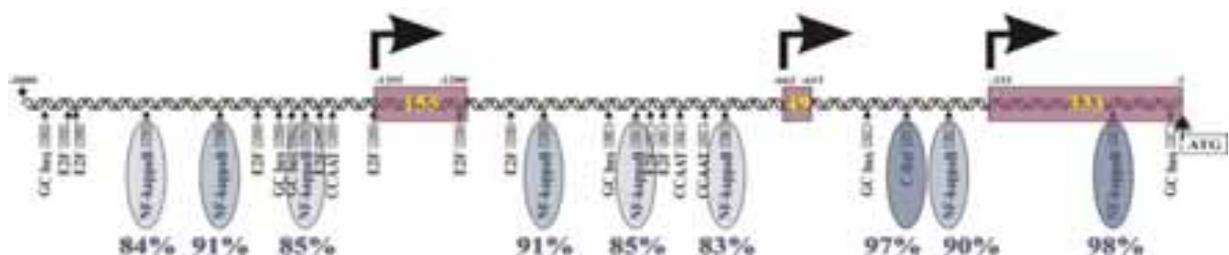


Figure 54 : Promoteur du gène *uhrfl* et localisation des sites de liaison potentiels à NF- κ B

NF- κ B, activé par *T. gondii*, pourrait être impliqué dans l'activation d'UHRF1 observés dans les cellules infectées.

Une autre hypothèse expliquant l'activation du gène *uhrfl* pour des temps précoces d'infection et la surexpression de la protéine pour des temps plus longs pourrait impliquer des

facteurs augmentant la demi-vie de cette protéine. En effet, nous avons observé après traitement des cellules au cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, que l'infection par *T. gondii* augmente la demi-vie de la protéine UHRF1. L'infection par *T.gondii* empêcherait la dégradation d'UHRF1 ce qui pourrait signifier que le parasite entraîne des modifications post-traductionnelles d'UHRF1, ou inhibe sa dégradation par le protéasome.

I. Régulation de l'expression d'UHRF1 par NF-κB lors de l'infection par *T. gondii*

I.1. NF-κB se lie au promoteur du gène *uhrf1* dans les cellules infectées

Pour démontrer la possible régulation du gène *uhrf1* par NF-κB, nous avons étudié dans un premier temps, par immunoprécipitation de la chromatine, la liaison de NF-κB au promoteur du gène *uhrf1* lors de l'infection par *T. gondii* (Figure 55).

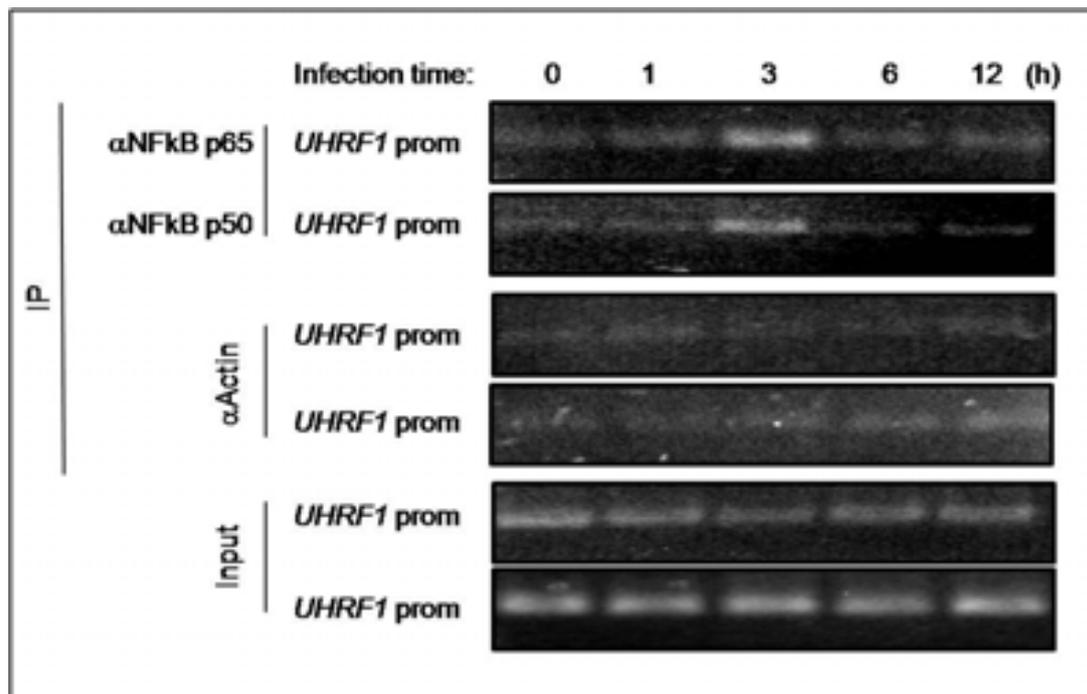


Figure 55 : Liaison de NF-κB au promoteur d'*uhrf1*. Les cellules BeWo sont infectées par *T. gondii* durant 0, 1, 3, 6 et 12 heures. La liaison de NF-κB au promoteur d'*uhrf1* est analysée par immunoprécipitation de la chromatine.

La liaison de NF-κB au promoteur du gène *uhrf1* suggère qu'il pourrait être un régulateur de ce gène, mais cela reste à démontrer.

I.2. Modulation de l'activité promotrice du gène *uhrfl* par NF-κB dans les cellules infectées

Nous avons ensuite supprimé l'activation de NF-κB par différents moyens et étudié l'activation du promoteur du gène *uhrfl* dans ces cellules après l'infection. Ceci est réalisé soit en cultivant les cellules en présence du peptide SN50 qui inhibe la translocation nucléaire de NF-κB (SN50 contient une séquence de localisation nucléaire de la sous-unité p50), soit en transfectant les cellules avec le plasmide IκB ou le plasmide contrôle IκB muté (3 mutations : 677, 678, 689 Serine en Alanine, le rendant inefficace) (Figure 56).

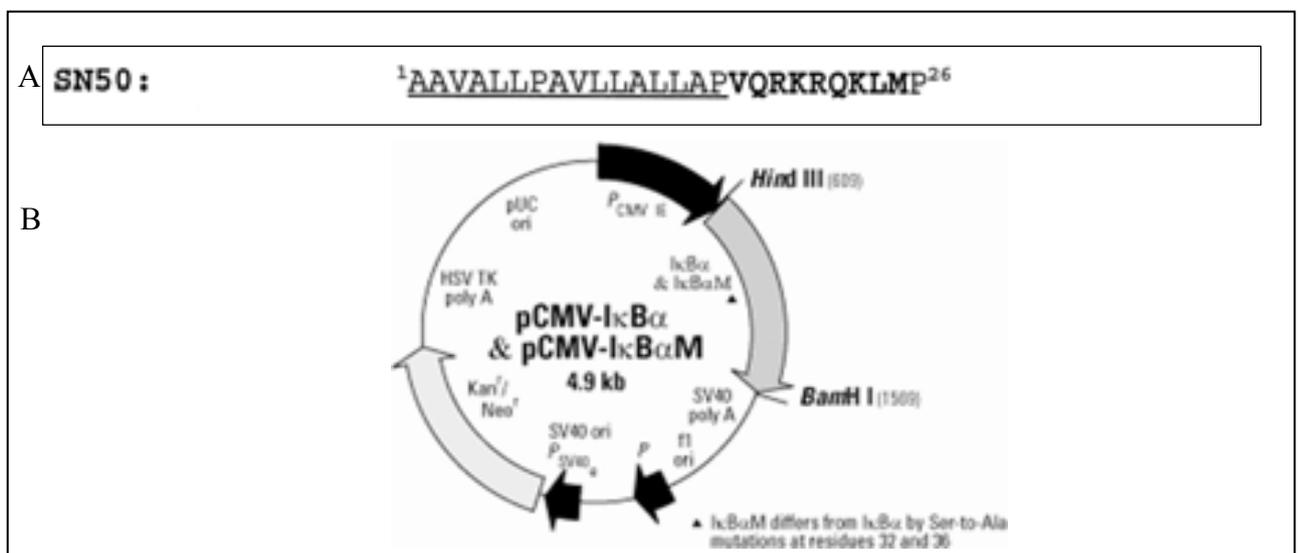


Figure 56 : A : Séquence du peptide SN50 (Lin *et al.*, 1995). B : Plasmides IκB et IκB muté (www.clontech.com)

L'activité du promoteur du gène *uhrfl* est analysée par le système luciférase (Figure 57). Les premiers résultats obtenus concernent la transfection des cellules avec les plasmides IκB et IκB muté. Nous observons qu'en l'absence de translocation dans le noyau et donc d'activation de NF-κB, le promoteur d'*uhrfl* n'est plus activé par l'infection.

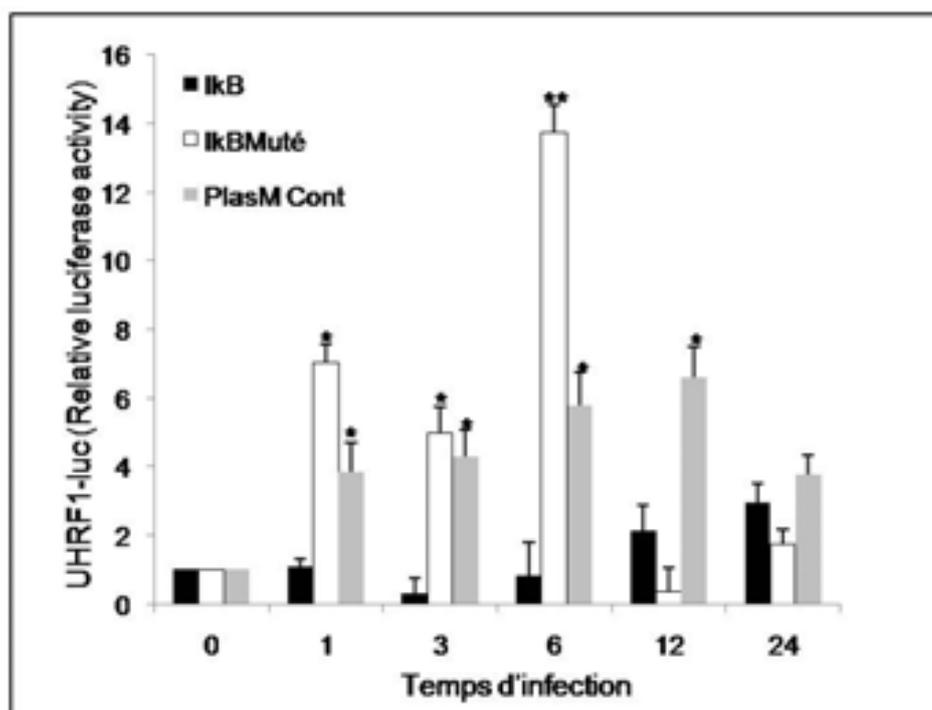


Figure 57 : Activité du promoteur d'*uhrf1* dans les cellules BeWo infectées par *T.gondii* en l'absence d'activation de NF- κ B. Les cellules BeWo sont transfectées par les plasmides IkB et IkB muté pendant 24 heures (2 μ g/ puits) en présence de FuGen®. Puis les cellules sont transfectées avec le plasmide pGL3-UHRF1-Luc pendant 24 heures supplémentaires. Elles sont ensuite infectées par *T. gondii* pendant 0, 1, 3, 6, 12 et 24 heures. L'activité du promoteur du gène *uhrf1* est déterminée par la mesure de l'activité luciférase (* 0,01 \leq p < 0,05).

I.3. Conclusion et Perspectives

Nous avons montré que *T. gondii* est capable de moduler l'expression d'UHRF1 via l'activation de NF- κ B. Ces expériences seront confirmées en utilisant le peptide SN50 ainsi que par la mesure de l'expression de la protéine UHRF1 par cytométrie en flux en l'absence d'activation de NF- κ B. La translocation de NF- κ B dans le noyau et l'activation d'UHRF1 dans les cellules infectées seront également analysées par immunofluorescence. De plus, ce résultat pourra être confirmé en utilisant le système double hybride qui nous permettra de mettre en évidence l'interaction directe entre NF- κ B et UHRF1. Plusieurs études montrent qu'il existerait des différences en fonction des souches, dans la cinétique d'activation de NF- κ B. Les études effectuées par microarrays ont démontré que les cellules infectées avec des souches de type II présentent des niveaux plus élevés de régulation des gènes de NF- κ B comparé aux cellules non infectées (Blader *et al.*, 2001). Il nous paraît donc intéressant de poursuivre cette étude en comparant différentes souches de virulence variée. Nous disposons d'une souche PRU de type II, d'une souche LEF (non virulente, France) et d'une souche RUB

(virulente, Guyane). Dans un premier temps, nous pourrions comparer les cinétiques d'activation de NF- κ B dans les cellules infectées en utilisant un kit permettant de séparer le noyau du cytoplasme et d'analyser les extraits résultant de cette séparation par Western blot. Ces résultats seront comparés, dans un deuxième temps, aux cinétiques d'activation du promoteur du gène *uhrf1* dans les cellules infectées par les diverses souches.

II. Implication de ROP16 dans la modulation de l'expression d'UHRF1

II.1. Modification post-traductionnelle de la protéine UHRF1 lors de l'infection

Les modifications post-traductionnelles entraînent un changement de la fonction de la protéine considérée, que ce soit sur son action, sa demi-vie, ou sa localisation cellulaire. La phosphorylation est une de ces modifications et correspond à un processus essentiel dans la régulation de l'activité des protéines nucléaires. La phosphorylation d'UHRF1 augmente sa liaison au promoteur du gène *TopoII α* , augmentant ainsi l'expression de la TopoII α (Bronner *et al.*, 2004). Nous avons analysé la phosphorylation d'UHRF1 dans les cellules infectées (Figure 58) par immunoprécipitation d'UHRF1 dans les cellules infectées, puis analysé sa phosphorylation par Western blot.

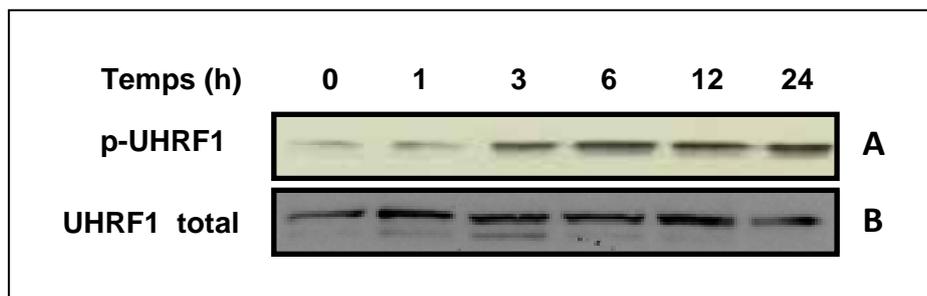


Figure 58 : Phosphorylation de la protéine UHRF1 dans les cellules infectées. Les cellules BeWo sont infectées par *T. gondii* durant 0, 1, 3, 6, 12 et 24 heures. La phosphorylation d'UHRF1 est déterminée par Western blot après immunoprécipitation des échantillons avec un anticorps anti-UHRF1. Les extraits ainsi immunoprécipités sont révélés par un anticorps anti-phosphosérine (A) ou un anticorps anti-UHRF1 (B).

L'infection par *T. gondii* des cellules BeWo induit une phosphorylation du facteur de transcription UHRF1, ce qui pourrait avoir pour conséquence une augmentation de sa demi-

vie. UHRF1 est une phosphosérine protéine (Trotzler *et al.*, 2004). Une kinase parasitaire pourrait être à l'origine de cette phosphorylation et parmi les facteurs parasitaires connus et possédant une fonction kinase active, on retrouve des protéines de rhoptries comme ROP16 et ROP18 qui sont des sérine/thréonine kinases.

II.2. Implication des rhoptries dans l'activation du facteur de transcription UHRF1

Toxoplasma appartient au phylum des Apicomplexae, défini par la présence d'un complexe apical comprenant des organelles sécrétoires parmi lesquelles se trouvent les rhoptries. Elles déchargent leur contenu dans le cytoplasme de la cellule-hôte mais également dans le noyau pour ROP16 qui possède une fonction kinase active et PP2C, une phosphatase (Figure 59/A). ROP16 cible les facteurs de transcription STAT3/6 (Yamamoto *et al.*, 2009). L'activation de STAT3 par *T. gondii* est impliquée dans la suppression de l'IL-12. De la même manière, ROP16 pourrait être responsable de la phosphorylation d'UHRF1 et donc de sa surexpression dans les cellules infectées.

Pour mettre en évidence l'implication des protéines de rhoptries dans ce phénomène, nous avons analysé par Western blot l'expression de la protéine UHRF1 dans des cellules infectées par le parasite préalablement traité à la cytochalasine D. La cytochalasine D permet la sécrétion des rhoptries mais prévient l'invasion de la cellule-hôte (Figure 59/B).

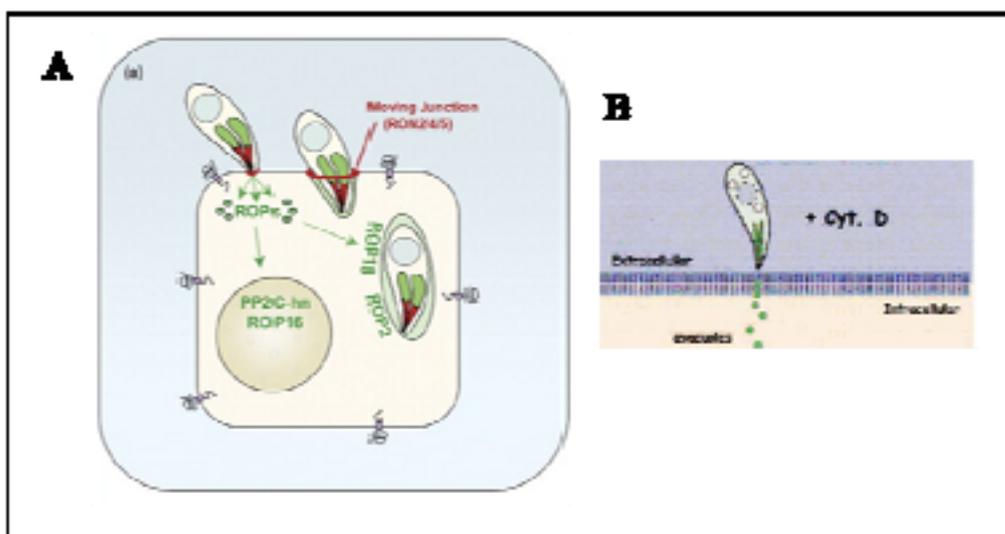


Figure 59 : A/ Sécrétion des rhoptries lors de l'invasion de la cellule-hôte. B/ L'utilisation de la cytochalasine D inhibe l'invasion mais permet le relargage des rhoptries (Håkansson *et al.*, 2001).

Nous observons qu'en présence de cytochalasine D, UHRF1 est surexprimée et phosphorylée (Figure 60).

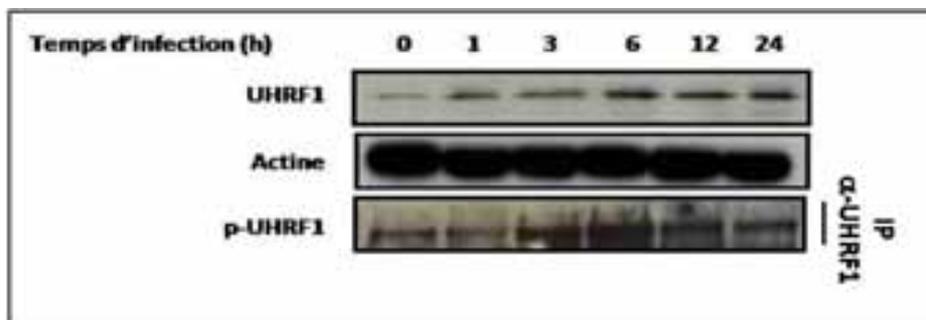


Figure 60 : Etude de l'expression d'UHRF1 dans les cellules BeWo infectées par *T. gondii* en présence de cytochalasine D. Les cellules BeWo sont infectées par *T. gondii*, les tachyzoïtes étant préalablement incubés en présence de cytochalasine D pendant 10 minutes. L'expression d'UHRF1 est analysée par Western Blot. La phosphorylation d'UHRF1 est déterminée par Western blot après immunoprécipitation des échantillons avec un anticorps anti-UHRF1. Les extraits ainsi immunoprécipités sont révélés par un anticorps anti-phosphosérine.

Ces données indiquent que ce facteur de transcription pourrait être régulé par un facteur parasite sécrété qui serait vraisemblablement une protéine de rhoptrie. Nous poursuivrons cette étude en étudiant l'activation d'*uhfr1* dans des cellules infectées par des tachyzoïtes traités par la Cytochalasine D.

II.3. Conclusion et Perspectives

La phosphorylation et l'activation d'UHRF1 semblent corrélées à la sécrétion des rhoptries. De plus, l'activité de liaison à l'ADN est influencée par la phosphorylation des facteurs de transcription. La phosphorylation d'UHRF1 observée dans les cellules infectées pourrait augmenter sa liaison aux promoteurs des gènes qu'il régule. La phosphorylation d'UHRF1 induite par *T. gondii* se produit plus tardivement qu'en réponse à la PKA (Trotzler *et al.*, 2004). Ceci pourrait résulter soit d'une moindre activité fonctionnelle de ROP16 en tant que sérine kinase, soit du temps nécessaire pour obtenir une quantité suffisante de ROP16 dans le noyau de la cellule-hôte.

ROP16 est impliquée dans l'activation et la phosphorylation du facteur de transcription STAT3. Nous poursuivrons notre étude en analysant l'implication éventuelle de ROP16 dans la régulation de l'activité d'UHRF1 dans les cellules infectées. Nous avons généré des

mutants de ROP16 pour étudier le rôle physiologique de ROP16 et de son site kinase sur l'activation d'UHRF1 et sa phosphorylation (Figure 61). Les cellules seront transfectées avec les différents mutants de ROP16 et l'activité d'UHRF1 sera analysée par le système luciférase.

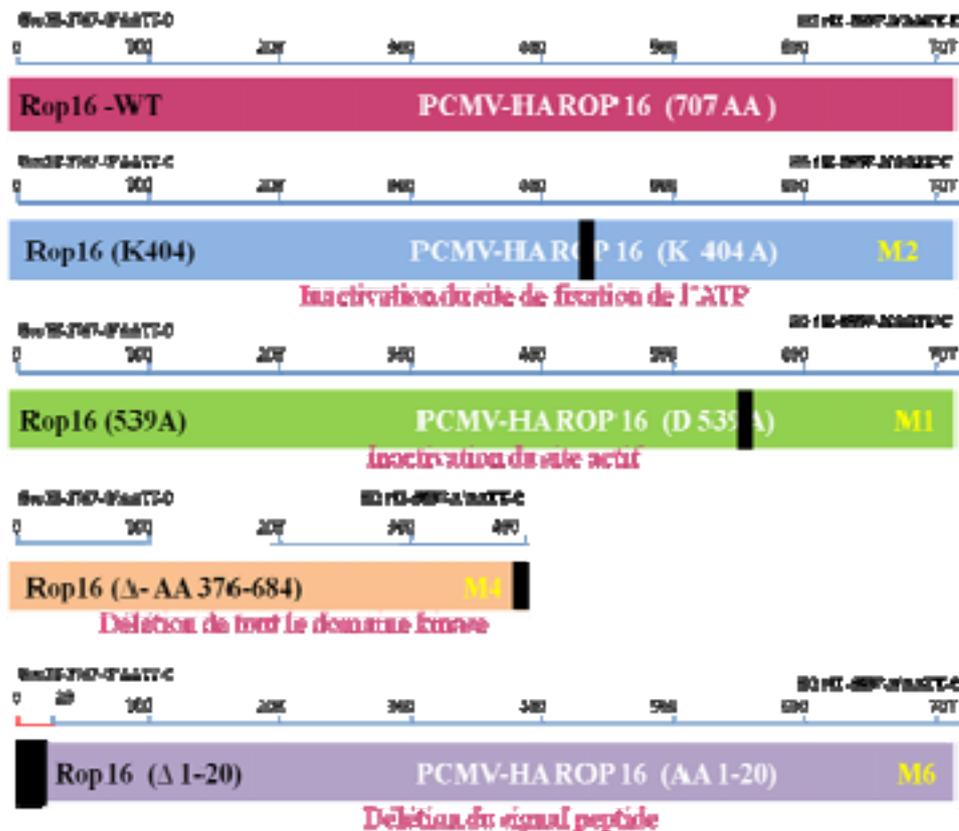


Figure 61 : Mutants réalisés de ROP16. Le mutant M1 présente une substitution d'un acide aspartique par une alanine en position 593. Le mutant M2 présente une substitution d'une lysine par une alanine en position 404. Le mutant M4 présente une délétion du domaine kinase (entre les acides aminés 376 et 684). Le mutant M6 présente une délétion du signal peptide (entre les acides aminés 1 et 20).

La phosphorylation d'UHRF1 sera étudiée par Western blot dans les cellules transfectées avec ROP16 (avec comme contrôle les mutants de ROP16, ROP18, SAG1...). Les facteurs de transcription STAT3 et NF- κ B sont différemment régulés en fonction des souches infectantes. L'activité luciférase du promoteur de *uhrf1* et l'expression d'UHRF1 seront analysées dans les cellules infectées par des souches de *T. gondii* de virulence différente (une souche de type II et deux souches atypiques). De plus, ROP16 est hautement polymorphique. En fonction des différences observées, une quantification de l'expression de ROP16 et un séquençage de

ROP16 de chaque souche pourront être effectués et corrélés éventuellement aux modifications d'activation d'*uhrf1*, comme cela a été constaté par Yamamoto *et al.* (2009) sur le gène *stat3*.

ROP16 peut soit directement phosphoryler et activer UHRF1, soit indirectement en activant un autre facteur régulant l'activité d'UHRF1. Pour tester la première hypothèse, nous utiliserons le système double hybride pour mettre en évidence une éventuelle interaction directe d'UHRF1 avec ROP16. Si tel était le cas, nous disposons également de mutants d'UHRF1 pour isoler le domaine responsable de cette interaction (Figure 62). Nous disposons également de protéines recombinantes UHRF1 et ROP16 qui nous permettront de réaliser un test de phosphorylation *in vivo* pour confirmer cette phosphorylation directe d'UHRF1 par ROP16.

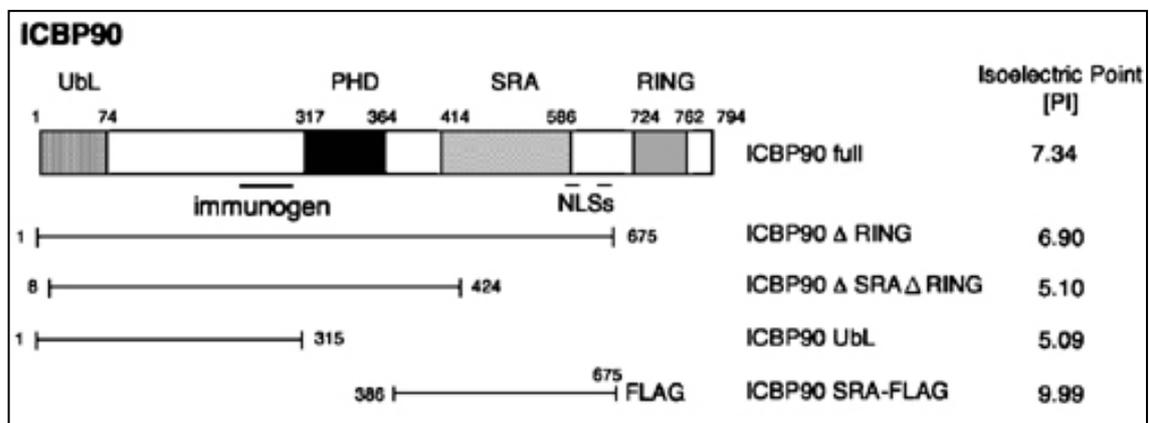


Figure 62 : Mutants délétés d'UHRF1 (Unoki *et al.*, 2004). Le premier mutant présente une délétion du domaine RING finger, le deuxième présente une délétion des domaines RING et SRA, le troisième mutant correspond au domaine UBL seul et le dernier mutant correspond au domaine SRA seul.

Nos résultats suggèrent que le parasite serait capable non seulement d'augmenter l'expression d'UHRF1 *via* l'activation de NF- κ B, mais aussi de modifier la stabilité de la protéine, probablement par phosphorylation, lors de la présence intracellulaire du parasite.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

En cas de toxoplasmose, il n'y a pas de traitement curatif définitif. Les vaccins sont encore largement à l'état de projet et donnent des résultats peu satisfaisants dans la prévention de la toxoplasmose congénitale. La seule prévention reste la prévention primaire alimentaire et le diagnostic précoce anténatal de la toxoplasmose congénitale. Il y a donc nécessité de trouver de nouveaux moyens d'intervention afin de prévenir non seulement la prolifération parasitaire mais aussi sa persistance intracellulaire par une approche pharmacologique. Notre étude sur les mécanismes de persistance associée à la régulation des facteurs de transcription est un premier pas indispensable afin de déterminer les meilleurs moyens d'intervention et d'élimination définitive du parasite.

Ce travail, réalisé dans le cadre d'une infection par une souche virulente de *T. gondii*, avait pour objectif d'étudier les voies de signalisation exploitées par le parasite pour établir un environnement favorable à sa réplication.

Dérégulation du cycle cellulaire des cellules-hôtes infectées.

Nous avons montré que l'infection induisait une dérégulation du cycle cellulaire des cellules-hôtes infectées avec un arrêt des cellules en phase G2 ainsi qu'un arrêt de prolifération de ces cellules. La régulation du cycle cellulaire des cellules infectées est un mécanisme largement reconnu et utilisé par les virus. Des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle d'infection par les virus du VIH-1, de l'hépatite B ou du papillomavirus humain et montrent également un arrêt dans la progression du cycle cellulaire en phase G2/M associé à une meilleure réplication virale (He *et al.*, 1995, Nakahara *et al.*, 2002, Chin *et al.*, 2010). Parmi les parasites connus pour moduler le cycle cellulaire des cellules infectées, il n'y a pas d'exemples connus d'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. *Leishmania* induit un arrêt des cellules en phase G0/G1. L'infection par les microsporidies du genre *Encephalitozoon* dérégule le cycle cellulaire en de multiples points. Les auteurs ont observé une diminution du pourcentage de cellules en phase G1 et en phase G2/M alors que le pourcentage de cellules en phase S augmente (Scanlon *et al.*, 2000, Kuzmenok *et al.*, 2005).

Dans notre expérience, parmi les molécules impliquées dans la régulation de la transition G2/M, la diminution d'expression de la cycline B semble être la cause majeure du blocage du cycle cellulaire en phase G2/M. De plus, nous avons observé une augmentation du facteur de transcription UHRF1 au cours de l'infection. Selon notre modèle, la dérégulation du cycle

cellulaire de la cellule infectée par *T. gondii* ferait intervenir l'augmentation d'expression d'UHRF1 favorisant la progression en phase S et un arrêt du cycle cellulaire dû, en partie à un défaut d'expression de la cycline B.

Il s'agit d'un mécanisme tout à fait singulier puisque, par exemple, dans le cas de l'infection par le VIH, les auteurs ont observé une phosphorylation de Cdk1 et une légère augmentation d'expression de la cycline B. La Cdk1 étant inactive sous sa forme phosphorylée, l'activité du complexe cycline B/Cdk1 est inhibée et les cellules arrêtées en phase G2/M (He *et al.*, 1995). Cependant, une récente publication montre qu'en réalité une protéine virale, Tat, régulerait l'expression de la cycline B de deux façons : dans un premier temps, Tat stimulerait la transcription de la cycline B, ce qui augmente l'expression de celle-ci et favorise l'apoptose des cellules et, deuxièmement, Tat stimulerait la dégradation, par polyubiquitination, de la cycline B, ce qui empêche l'expression de niveaux excessifs de cycline B dans les cellules. Ce double mécanisme de régulation de la cycline B permettrait d'une part, de faciliter la réplication virale et d'autre part de faciliter la libération du virus après apoptose de la cellule-hôte (Zhang *et al.*, 2010).

Molestina *et al.*, (2008) ont également montré que d'autres cyclines, Cdks et molécules impliquées dans la régulation du cycle cellulaire sont modulées lors de l'infection. L'expression des cyclines D et E, impliquées dans la progression de la phase G1 et la transition G1/S, augmente, alors que les auteurs observent l'absence de cycline A, impliquée dans la progression de la phase S, au cours de l'infection. Ils ne détectent la cycline B qu'après 32 heures d'infection. Les auteurs proposent un modèle dans lequel la dérégulation du cycle cellulaire dans les cellules infectées se ferait de la manière suivante : *T. gondii* induit l'augmentation des cyclines D et E favorisant respectivement la progression de la phase G1 et la transition vers la phase S. Cependant, les cellules infectées présentent un retard dans la progression du cycle qui s'explique en partie par un défaut d'accumulation des cyclines A et B.

De la même façon que pour le VIH, l'augmentation tardive, après 32 heures d'infection de la cycline B pourrait faciliter l'égression du parasite par apoptose de la cellule-hôte, bien que l'apoptose de la cellule ne soit pas indispensable pour l'égression parasitaire.

Parallèlement, nous avons mis en évidence un nouveau facteur de transcription, UHRF1, dont l'expression est modulée lors de l'infection et qui est indispensable à la prolifération parasitaire. Seul HIF1 était connu comme étant indispensable à la prolifération parasitaire et

ce dans des conditions d'hypoxie. Il pourrait être impliqué dans la croissance parasitaire de par les gènes qu'il régule et qui sont impliqués dans la survie cellulaire, le métabolisme du fer et du glucose et la prolifération cellulaire (Spear *et al.*, 2006). La nature des gènes régulés par UHRF1 dans le cadre de l'infection par *T. gondii* reste encore à déterminer.

Contrairement à HIF1 qui peut également être activé par d'autres pathogènes comme *Bartonella henselae*, *Staphylococcus aureus*, le virus Epstein Barr ou *Leishmania amazonensis* (Moreilhon *et al.*, 2005; Riess *et al.*, 2004; Wakisaka *et al.*, 2004; Arrais-Silva *et al.*, 2005), il s'agit du premier exemple d'activation d'UHRF1 en dehors de son implication reconnue dans certains cancers.

Régulation du gène de la *cycline B* dans les cellules infectées par *T. gondii*

UHRF1 est impliqué dans la régulation du gène de la *cycline B* au cours de l'infection de par sa faculté à se lier aux promoteurs de certains gènes, dont celui de la *cycline B* et à favoriser la formation d'hétérochromatine par le recrutement d'enzymes responsables de la modification des histones mais également des méthyltransférases. Les mécanismes moléculaires permettant à UHRF1 de se lier au promoteur de la *cycline B* ne sont pas encore totalement bien définis. Cette liaison fait intervenir les CCAAT box du promoteur du gène de la *cycline B*. Par contre, l'implication de la méthylation du promoteur de ce gène n'a pas pu être démontrée dans ce travail, quoique nous n'ayons pas entièrement séquencé tout le gène à la recherche d'îlots méthylés en dehors du promoteur. Des expériences préliminaires ont été menées en déméthylant les cellules par l'utilisation d'azacytidine, analogue nucléosidique incorporé dans l'ADN, inhibant les méthyltransférases et induisant une déméthylation de l'ADN. Nous avons étudié la liaison d'UHRF1 au promoteur de la *cycline B* en présence d'azacytidine dans les cellules infectées par *T. gondii*. Nous avons observé qu'en l'absence de méthylation du promoteur de la *cycline B*, UHRF1 se fixe dans une moindre mesure à ce promoteur. Ceci suggère qu'UHRF1 reconnaît et se fixe au promoteur de la *cycline B* lors de l'infection lorsque celui-ci est méthylé. Cependant, nous avons également observé un effet non spécifique du traitement de l'azacytidine sur l'expression d'UHRF1 (surexpression continue de la protéine entre 0 et 6 heures d'infection puis diminution importante après 12 heures). De plus, nous avons constaté une forte toxicité de l'azacytidine sur notre modèle cellulaire. Ceci ne nous permet donc pas de conclure, pour l'instant, que le parasite manipule l'expression de la *cycline B* *via* le statut de méthylation de la cellule-hôte en exploitant UHRF1. Nous

envisageons de renouveler ces expériences en utilisant un autre analogue nucléosidique, la 5-AZA-2'-deoxycytidine qui serait plus spécifique puisque n'étant pas incorporée dans l'ARN (comme c'est le cas pour la 5-Azacytidine) mais uniquement dans l'ADN.

Altérations épigénétiques induites par l'infection à *T. gondii*

T. gondii est un parasite unique, capable de moduler l'expression des gènes en interférant avec deux modifications épigénétiques importantes que sont la méthylation et la modification des histones.

- Leng *et al.*, (2009) ont montré que *Toxoplasma* inhibait la transcription du TNF- α en interférant avec le remodelage de la chromatine requise pour l'activation transcriptionnelle du promoteur du TNF, ce qui conduit à la régulation négative de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires qui sont régulés par le TNF- α . Parmi les modifications des histones, la phosphorylation de la sérine 10, l'acétylation des lysines 9 et 14 et la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 sont associées à l'activation des gènes. *Toxoplasma* bloque la phosphorylation de l'histone H3 ainsi que l'acétylation des lysines.

- Nous avons montré que l'infection par *T. gondii* induit une hyperméthylation d'une partie du génome de la cellule-hôte en modulant l'expression des Dnmts. La méthylation étant un mécanisme épigénétique utilisé pour inactiver certains gènes.

UHRF1 est un facteur de transcription qui relie ces deux modifications épigénétiques. Pour favoriser la prolifération parasitaire, il pourrait recruter un complexe, contenant des méthyltransférases et des histones déacétylases, qui associé à l'activité ubiquitine ligase d'UHRF1 serait capable de modifier la chromatine en établissant un environnement hétérochromatinique au niveau des promoteurs de certains gènes importants pour la survie et la prolifération intracellulaire du parasite. La nature des gènes cibles d'UHRF1 et des gènes-hyperméthylés lors de l'infection reste encore à déterminer.

La modulation des modifications épigénétiques est un mécanisme reconnu chez certaines bactéries et virus. *Toxoplasma* représente le premier exemple de parasite protozoaire capable d'interférer avec le remodelage de la chromatine de certains gènes.

Certains virus sont capables d'induire une méthylation de certains gènes-hôtes pour notamment supprimer la réponse immunitaire de l'hôte. Le virus de l'hépatite B et notamment

la protéine HBx (hepatitis B virus X protein) est capable d'interagir avec Dnmt3a pour moduler l'expression de certains gènes (Zheng *et al.*, 2009). *Listeria monocytogenes*, bactérie pathogène, induit une déphosphorylation de l'histone H3 ainsi qu'une désacétylation de l'histone H4 au cours des phases précoces de l'infection. Cet effet est médié par une toxine, la listériolysine O. Un effet similaire est également observé pour d'autres bactéries, telles que *Clostridium perfringens* et *Streptococcus pneumonia*. Ceci est corrélé à une diminution de l'activité transcriptionnelle de certains gènes et notamment ceux impliqués dans l'immunité (Hamon *et al.*, 2007). *Shigella flexneri* inhibe la phosphorylation des histones H3, modification nécessaire à l'inactivation des gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée (Arbibe *et al.*, 2007).

Modulation de l'expression d'UHRF1 dans les cellules infectées

L'activation d'UHRF1 ferait intervenir le facteur de transcription NF- κ B, activé par la présence intracellulaire du parasite. Une modification de la demi-vie, de l'activité et de la liaison d'UHRF1 aux promoteurs des gènes qu'il régule pourrait également faire intervenir la phosphorylation de ce facteur par une kinase parasitaire relarguée par les rhoptries. Notre hypothèse est que, de la même façon que STAT3, ROP16 serait responsable de la phosphorylation d'UHRF1. ROP16 étant hautement polymorphique, ces résultats seront repris dans le cas d'une infection avec des souches de virulence variée.

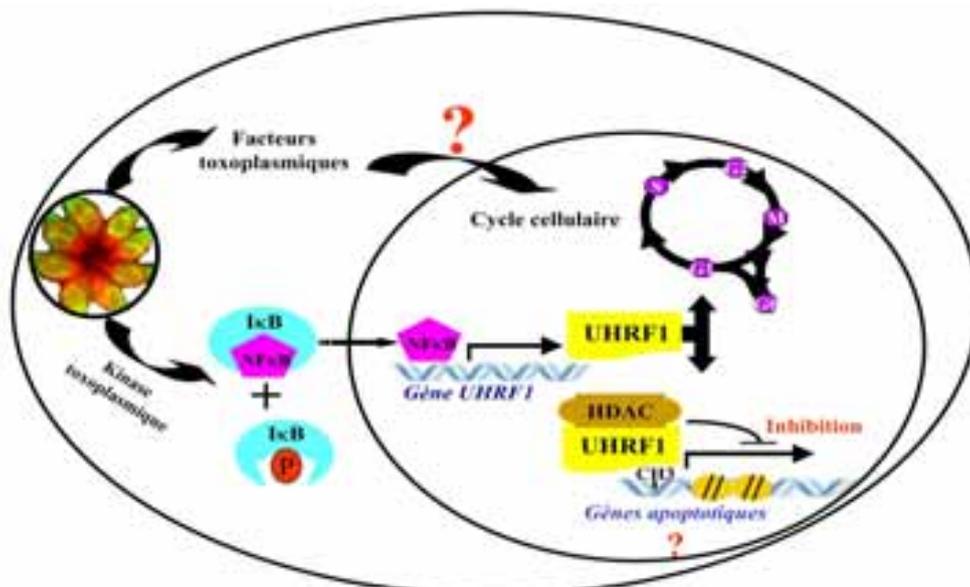


Figure 63 : Modèle proposé d'activation d'UHRF1 dans les cellules infectées par une souche de type I de *T. gondii* et son implication dans la modulation du cycle cellulaire et de l'expression du génome des cellules-hôtes.

Perspectives

De nombreuses perspectives sont envisageables à partir de nos données afin de démontrer les différentes hypothèses émises ou de confirmer certains points de notre étude.

Il est nécessaire de confirmer l'implication de NF- κ B et de ROP16 dans l'activation d'UHRF1 lors de l'infection des cellules par *T. gondii*. Par ailleurs, nous avons observé une méthylation d'une partie du génome de la cellule-hôte. La nature des gènes méthylés lors de l'infection pourra être analysée par microarrays et pourrait ouvrir de nouveaux champs d'investigation. Il nous paraît également primordial d'étudier la nature des facteurs parasitaires responsables des effets que nous avons observés. La connaissance des gènes cibles et régulés par UHRF1 lors de l'infection est également un axe de recherche que nous aimerions développer et ce par immunoprécipitation de la chromatine. Enfin, le modèle de toxoplasmose oculaire développé dans le laboratoire et permettant de reproduire la pathologie humaine chez les souris infectées a permis de mettre en évidence des niveaux de mRNA UHRF1 très élevés en cas de primo-infection par rapport au modèle de réinfection où l'inflammation est plus modérée. Plus l'inflammation clinique est sévère, plus UHRF1 est exprimé. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques par l'injection intraoculaire d'ARN-interférents dirigés contre UHRF1 par exemple en association avec les anti-infectieux classiques. Cette technique est déjà en cours d'expérimentation chez l'homme pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge par l'injection de SiRNA ciblant VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Tolentino *et al.*, 2004).

La modulation de la machinerie épigénétique de la cellule-hôte par le parasite permet d'entrevoir de nouvelles perspectives thérapeutiques anti-parasitaires ciblant 1) directement UHRF1, 2) le remodelage de la chromatine, ou 3) le cycle cellulaire de la cellule-hôte (Figure 33) (Unoki *et al.*, 2009) :

1) Thérapies ciblant directement UHRF1 : de la même manière que les nouvelles thérapeutiques anticancéreuses ciblant UHRF1 discutées précédemment, l'utilisation de molécules ciblant UHRF1 pourrait empêcher la prolifération des parasites et de là leur persistance dans les cellules-hôtes, toutefois il est fort probable que ce point d'intervention ne s'observe que dans la phase aiguë de la maladie.

2) Thérapies ciblant le remodelage de la chromatine : une autre stratégie pourrait consister à inverser la méthylation de l'ADN induite par le parasite. Un analogue de la cytosine, l'Azacitidine, est principalement utilisé dans le traitement du syndrome myélodysplasique. D'autres changements épigénétiques ont également le potentiel d'être la cible du développement de nouvelles approches thérapeutiques. C'est le cas des inhibiteurs des HDAC tels que SAHA (Suberoylanilide Hydroxamic Acid). C'est une approche intéressante *in vitro* mais probablement peu réalisable *in vivo* car les mécanismes de régulation de la méthylation de la cellule-hôte mis en jeu dans la toxoplasmose sont probablement non-spécifiques.

3) Thérapie moléculaire ciblant le cycle cellulaire des cellules-hôtes : il a été montré que *T. gondii* était capable de déréguler le cycle cellulaire de la cellule infectée. De plus, l'infection modifie également le cycle cellulaire des cellules avoisinantes, non infectées, pour permettre au parasite d'envahir plus facilement de nouvelles cellules. Par conséquent, l'utilisation d'un médicament modifiant l'état du cycle de la cellule-hôte pourrait perturber la prolifération du parasite. Le paclitaxel, qui est l'un des médicaments induisant un arrêt en phase G1 et qui est utilisé en clinique, supprime la prolifération intracellulaire de *T. gondii* dans les fibroblastes confluents, bien qu'il ne puisse empêcher l'infection (Estes *et al.*, 1998).

Cependant, l'étude et l'identification des facteurs parasitaires responsables des modifications observées dans cette étude pourraient constituer un point d'impact plus réaliste dans le développement de nouvelles thérapies anti-parasitaires qui seraient plus spécifiques. D'autant plus, que Yamamoto *et al.*, (2009) ont montré que la substitution d'un seul acide aminé en position 503 du domaine kinase de ROP16 induit une diminution significative de l'activation de STAT3. La substitution d'une leucine par une sérine détermine la différence d'activation de STAT3 entre les souches de type I et II : l'activation de STAT3, observée avec les souches de type I, est déficiente dans le cas d'une infection avec une souche de type II (Butcher *et al.*, 2005). La substitution d'un seul acide aminé dans la séquence de ROP16 est capable

d'entraîner des différences de modulation du facteur de transcription STAT3, de moduler la réponse immunitaire et d'altérer la virulence d'une souche de *T. gondii* .

Review: Drug discovery targeting epigenetic codes: the great potential of UHRF1, which links DNA methylation and histone modifications, as a drug target in cancers and toxoplasmosis

Motoko U¹, Brunet J², Mousli M².

Biochem Pharmacol. 2009

¹Laboratory of Human Carcinogenesis, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, NIH, Bethesda, Maryland 20892-4258, USA.

²Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg, UPRES E.A. 3950 Interactions Cellulaires et Moléculaires Hôte-Parasite, Faculté de Médecine. Université Louis Pasteur, 67000 Strasbourg, France

Résumé de la revue

UHRF1 joue un rôle central dans le transfert de statut de méthylation des cellules-mères aux cellules-filles. Son domaine SRA reconnaît l'ADN hémi-méthylé qui apparaît dans les brins d'ADN fille pendant la duplication de l'ADN. UHRF1 recrute DNMT1 et se lie également à HDAC1 et à l'histone H3 di ou tri-méthylé, ubiquitinye l'histone H3 et est associé à la formation de l'hétérochromatine, indiquant qu'UHRF1 relie la modification des histones, la méthylation de l'ADN et la structure de la chromatine. UHRF1 est une cible directe de E2F1 et favorise la transition G1 / S. p53, qui est absent dans 50% des cancers, régule négativement UHRF1 par une augmentation de p21 et la désactivation ultérieure de E2F1. Les niveaux d'expression d' UHRF1 sont régulés dans de nombreux cancers, probablement en partie en raison de l'absence de p53, mais il est probablement aussi par plusieurs autres facteurs. L'absence d'expression d'UHRF1 dans les cellules cancéreuses supprime la croissance cellulaire, suggérant qu'UHRF1 pourrait être une nouvelle cible thérapeutique anticancéreuse. Récemment, il a été montré qu'UHRF1 jouait un rôle important non seulement dans la carcinogenèse, mais aussi dans la toxoplasmose. *Toxoplasma gondii* exploiterait UHRF1 pour moduler le cycle cellulaire de la cellule-hôte et favoriser sa prolifération. Ainsi, l'absence

d'UHRF1 pourrait être efficace pour arrêter la prolifération parasitaire dans les cellules infectées. Dans cette revue, nous discuterons de plusieurs méthodes possibles qui pourraient inhiber les multiples fonctions uniques du facteur de transcription UHRF1 et qui pourraient être utilisées pour le traitement de cancers et de la toxoplasmose.

MATERIEL ET METHODES

I. Culture cellulaire

Les cellules trophoblastiques humaines (BeWo) ont été obtenues auprès de l'American Type Culture Collection et cultivées dans un milieu FK12, supplémenté par 10% sérum inactivé de veau fœtal (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 10 UI / ml de pénicilline et 10 mg / ml de streptomycine (Invitrogen). Les fibroblastes NHDF (Promocell, Heidelberg, Germany) sont cultivées selon les recommandations du fournisseur. Les cultures cellulaires sont maintenues à 37°C et sous 5% de CO₂ et le comptage des cellules est fait sur cellule de Neubauer après coloration au bleu Trypan.

II. Culture *in vivo* de *T. gondii*

Les tachyzoïtes de la souche RH sont obtenus par passages successifs de 10⁶ tachyzoïtes injectés par voie intra-péritonéale à des souris Swiss. Les souris sont euthanasiées 4 jours plus tard par inhalation d'isoflurane. Le liquide d'ascite est récupéré par ponction et lavage de la cavité péritonéale avec 5 mL de PBS stérile. Avant utilisation, les tachyzoïtes sont lavés deux fois dans du PBS et comptés en utilisant le bleu Trypan. L'observation au microscope a montré une absence presque complète de cellules murines dans les échantillons.

III. Traitements chimiques

Les cellules BeWo ont été cultivées en absence ou en présence de 10 µM de 5- azacytidine (Sigma-Aldrich, St Quentin, France) pendant 12 h. Les cellules ont été lavées deux fois avec du milieu frais et infectées par *T. gondii* comme décrit dans les légendes des figures. Les expériences menées avec la λ-phosphatase ont été réalisées à partir d'extraits protéiques traités pendant 30 minutes à 30°C avec la λ-phosphatase (100 U/ échantillon). Les cellules BeWo sont également cultivées en présence de L-Mimosine (200 µg/mL) ou de Nocodazole (50 ng/mL) pendant 24 heures, puis les cellules sont infectées.

Pour empêcher le relarguage des rhoptries, les cellules sont infectées avec des tachyzoïtes préalablement incubés avec la cytochalasine D (Sigma-Aldrich). Les parasites ont été incubés pendant 10 minutes avec 1 µM de cytochalasine D. Ils sont ensuite centrifugés et le culot est repris dans du milieu de culture et les parasites sont mis en contact avec la culture cellulaire.

IV. Anticorps et produits chimiques

Les anticorps polyclonaux anti-*T.gondii* ont été produits dans des lapins Néo-Zélandais par quatre injections sous cutanées de 50 µg d'antigène soluble de *T. gondii* en suspension dans l'adjuvant incomplet de Freund. La fraction IgG de ce sérum a été purifiée par chromatographie sur DEAE Trisacryl (1 M) et testée par ELISA. L'anticorps monoclonal de souris anti-SAG1 a été produit au sein de notre laboratoire selon la méthode décrite par (Rodriguez *et al.*, 1985). L'anticorps monoclonal de souris (clone 1RC1C-10), dirigé contre UHRF1, a été conçu comme décrit par Hopfner *et al.*, (2000).

Le tableau ci-dessous indique les anticorps primaires utilisés en Western blot, immunofluorescence, immunoprécipitation (IP) et cytométrie en flux avec leur dilution et leur provenance.

	Provenance	Dilution
anti-Cdk1 monoclonal de souris	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)	1 : 200
anti-p21 monoclonal de souris	Santa Cruz Biotechnology	1 : 200
anti-p53 monoclonal de souris	Santa Cruz Biotechnology	1 : 200
anti-cycline B1 monoclonal de souris	Santa Cruz Biotechnology	1 : 200
anti-actine monoclonal de souris	Santa Cruz Biotechnology	1 : 200
Anti-NF-κBp50 monoclonal de souris	Santa Cruz Biotechnology	IP : 5 µg
Anti-NF-κBp65 monoclonal de souris	Santa Cruz Biotechnology	IP : 5 µg
Anti-phosphosérine monoclonal de souris	Santa Cruz Biotechnology	1 : 200
anti-Cdk1p (Thr 14 /Tyr 15) polyclonaux de lapin	Santa Cruz Biotechnology	1 : 200
anti-phospho-H3 polyclonaux de lapin	Upstate (Temecula, CA)	1 : 200

Le tableau ci-dessous indique les anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence, cytométrie en flux et Western blot.

Utilisation	Anticorps	Provenance	Dilution
Anticorps secondaires conjugués utilisés en Western blot	Anti-IgG de souris peroxydase	Roche Diagnostics	1/10 000
	Anti-IgG de lapin peroxydase	Roche Diagnostics	1/ 30 000
Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence ou en cytométrie en flux	Alexa fluor 488 anti-immunoglobuline de lapin	Invitrogen	1/400
	Alexa fluor 546 anti-immunoglobuline de souris	Invitrogen	1/400

Le Tween-20 et le cocktail inhibiteur de protéases ont été obtenus auprès de Roche Diagnostics (Meylan, France). Le système de détection ECL provient d'Amersham Biosciences (GE Healthcare Europe GmbH, Orsay, France) et le TriReagent de Molecular Research Center (Cincinnati, OH). L'iodure de propidium a été obtenu auprès d'Invitrogen. Le Hoechst H33258, le G418, la L-mimosine et le nocodazole proviennent de Sigma-Aldrich et la λ -protéine phosphatase chez Ozyme (St Quentin, France).

V. Préparation des plasmides et souches bactériennes

Les souches bactériennes TOP10 (Invitrogen) sont transformées par choc thermique. 10 μ L de plasmide sont mis en contact avec les bactéries décongelées puis incubés dans la glace 30 minutes. Le tube est ensuite placé 1 minute à 42°C, puis 5 minutes sur la glace. On ajoute 250 μ L de milieu SOC à proximité de la flamme et le tube est incubé 1 heures à 37°C sous agitation. 100 μ L sont étalés sur une boîte de culture contenant du milieu LB et l'antibiotique approprié puis incubé 12 heures dans un incubateur à 37°C. Une colonie sera utilisée pour amplification et extraction de l'ADN.

Les midi-préparations d'ADN plasmidique sont effectuées avec le HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) d'après les recommandations du fournisseur.

VI. Cytométrie en flux

Les cellules BeWo sont cultivées en plaque 6 puits et infectées par *T. gondii* lorsqu'elles sont à environ 80% de confluence avec un rapport d'infection de 1 :1. Pour chaque expérience, un puits est utilisé pour compter les cellules et adapter le nombre de tachyzoïtes. Les cellules sont récoltées à l'aide de la trypsine (Invitrogen) et lavées 3 fois au PBS. Elles sont ensuite fixées pendant 15 minutes sur glace avec 5% de formaldéhyde, lavées au PBS et reprises dans 1 mL d'éthanol. Les cellules infectées sont identifiées par cytométrie en flux après incubation pendant 45 minutes avec le sérum polyclonal anti-*T. gondii* ou monoclonal anti-SAG1. Les cellules sont ensuite lavées et incubées pendant 45 minutes avec les anticorps secondaires marqués Alexa 488 anti-Ig de lapin ou Alexa 546 anti-Ig de souris respectivement. Le cycle cellulaire a été étudié par cytométrie en flux après incubation pendant 2 heures avec 50 µg/mL d'iodure de propidium et 50 µg/mL de RNase à température ambiante dans l'obscurité. Les cellules en phase G2/M ont été marquées par l'anticorps anti-phospho-H3 pendant 45 minutes puis l'Alexa 488 anti-Ig de lapin pendant 45 minutes. La fluorescence est analysée par cytométrie en flux (FACScan flow cytometer) sur 30 000 cellules et les données sont analysées avec le logiciel CellQuest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

VII. Western blot et co-immunoprécipitation

Une fois les cellules récoltées, elles sont lavées 2 fois au PBS et centrifugées à 280g, pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est repris dans 350 µL de cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche Diagnostics, Meylan, France) et soumis aux ultra-sons 4 fois 10 secondes avec 1 minute d'interruption dans la glace. La suspension est centrifugée à 10 000g pendant 20 minutes à 4°C.

Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Bradford avec une gamme étalon de BSA de 8 points de 0 à 1mg/ml. 250µl de cette solution sont déposés dans une plaque 96 puits ainsi que 10µl d'échantillons dilués ou non, ou 10µl de la gamme étalon. La DO est lue à 590 nm au spectrophotomètre. Une droite de régression est réalisée à partir de la gamme et les

Un gel d'électrophorèse à 10% d'acrylamide est utilisé pour analyser les extraits protéiques dans des conditions dénaturantes (0,1 % de SDS, Sodium Dodecyl Sulfate). Les protéines totales (30 µg) sont mélangées à 5 µL de tampon de dissociation (Laemmli et β mercapto-éthanol) et incubées 5 minutes à 100°C. Elles sont déposées dans les puits ainsi que 8 µL d'un marqueur de poids moléculaires protéiques (Precision Plus Standards, BioRad, Marnes La Coquette, France). La migration a lieu en tampon Tris base (0,25 M) Glycine (2 M) et SDS (0,1 %) pendant 45 min à 200 V (Système Mini-PROTEAN 3, BioRad).

Les protéines sont transférées sur membrane de PVDF (Biorad) pré-incubée dans du tampon de transfert (Tris base 0,25 M Glycine 2 M et Méthanol 20%) pendant 1h00 à 250 mA. La révélation des protéines se fait par incubations séquentielles avec une solution de saturation (PBS contenant 5 % + lait écrémé en poudre 0.1%) pendant une nuit sous agitation à 4°C, des anticorps primaires dilués dans du PBS + lait 0,1 % pendant 2 h sous agitation à température ambiante, des anticorps secondaires couplés à la peroxydase dilués dans du PBST (PBS + Tween 0,05%) + lait 0,1 % pendant 1 h sous agitation à température ambiante. Ces étapes sont séparées par des séquences de 3 lavages de 10 min avec du PBST + lait 0,1%. La révélation est faite par autoradiographie par l'ajout du substrat chimioluminescent (ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences) pendant 5 min puis mise en contact avec un film photographique (BioMax Light Film, Kodak, Chalon sur Saône, France). Après 10 min d'exposition à température ambiante, le film est développé pendant 1 minute dans du révélateur dilué au 1/10 dans de l'eau (X ray developer LX24, Kodak), rincé à l'eau pendant 20 secondes et fixé pendant 1 minute dans du fixateur dilué au 1/5 dans de l'eau (X ray fixer AL24, Kodak). Après un rinçage final de 5 minutes dans de l'eau, le film est séché à l'air libre.

La co-immunoprécipitation de p21 est réalisée sur des extraits protéiques de cellules infectées ou non. Les protéines sont incubées avec des billes de protéines G (Sigma-Aldrich), et de PBS + du cocktail inhibiteur de protéases pendant 2 heures à 4°C. Après centrifugation, le surnageant clarifié est incubé pendant 4 heures, à 4°C sous agitation avec l'anticorps anti-p21 (5 µg). Les billes de protéines G sont ensuite ajoutées et l'on incube l'échantillon 12 heures, à 4°C sous agitation.

VIII. Transfection

Les nucléotides correspondant à UHRF1 ont été insérés dans un vecteur d'expression de SiRNA, psiU6BX3. Lorsqu'elles sont à 60% de confluence, les cellules BeWo sont transfectées par les plasmides SiRNA-EGFP ou SiRNA-UHRF1 à l'aide du FuGen (Roche) comme agent transfectant pendant 24 h : 3 μ L de FuGen sont placés dans 97 μ L de milieu sans sérum et incubés 5 minutes. Deux μ g d'ADN sont ajoutés dans le tube et incubés 30 minutes à température ambiante. L'ensemble est ensuite placé dans la culture cellulaire en milieu sans sérum. Les cellules sont ensuite incubées avec 900 μ g / ml de G418 pour 48 h avant l'infection par *T. gondii*. Les cellules sont ensuite récoltées et les extraits analysés par Western blot, immunofluorescence ou RT-PCR. Les plasmides cycline B1-WT et cycline B1- Δ CCAAT nous ont été généreusement fournis par le docteur Engeland, Université de Leipzig, en Allemagne. Les plasmides I κ B et I κ B muté ont été obtenus auprès d'Ozyme. Les cellules BeWo ont été transfectées par les plasmides (2 μ g / puits) pendant 24 h, infectées par *T. gondii* et récoltées pour les essais d'immunoprécipitation de la chromatine.

IX. Immunofluorescence

Les cellules NHDF sont cultivées en plaque 6 puits sur des lamelles rondes en verre (Dutcher, Brumath, France). Elles sont infectées pendant différents temps comme indiqué dans les légendes des figures, puis lavées 3 fois au PBS. Les cellules sont fixées pendant 15 minutes au paraformaldéhyde puis lavées au PBS pendant 20 minutes. Elles sont ensuite perméabilisées à l'aide de Triton X-100 0,1%. Les lamelles sont ensuite saturées avec un tampon contenant de la BSA 5% puis marquées par incubation pendant 2 heures avec les anticorps anti-UHRF1 ou anti-PH3, lavées et incubées pendant 45 minutes avec les anticorps secondaires conjugués à l'Alexa 546 ou 488. Les cellules sont lavées une nouvelle fois et incubées 5 minutes avec le Hoechst (Sigma-Aldrich). Après un dernier lavage, les lamelles sont montées à l'aide d'un liquide de montage (Mowiol, Sigma-Aldrich) puis la fluorescence est observée à l'aide d'un microscope à fluorescence Zeiss (Le Pecq, France). Les données sont acquises par une caméra MRc5 Zeiss et analysées à l'aide du logiciel AxioVision (Zeiss).

X. PCR quantitative et analyse par RT-PCR

Les cellules BeWo ont été cultivées dans des plaques 6 puits, infectés par *T. gondii* et lysées avec le TriReagent. L'ARN total a été extrait selon les recommandations du fabricant. 5 µg d'ARN ont ensuite été soumis à une transcription inverse en utilisant le Kit First-Strand cDNA synthesis (General Electric Health Care, Orsay, France). Les primers ont été utilisés à une concentration finale de 1 µM. Le tableau ci-dessous indique l'ensemble des amorces utilisées dans ces travaux.

La quantification des ADNc a été réalisée sur le LightCycler PCR system, en utilisant le kit LightCycler-DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, Meylan, France). Le mélange suivant est réalisé : 11 µL d'eau pure, 1 µL de chaque primer 20 µM, 2 µL de master mix et 1µL d'ADN. Le mélange est placé dans des capillaires et centrifugé à basse vitesse. Le programme suivant est utilisé : après 7 min de dénaturation à 95 ° C puis 40 cycles (5 s à 95 ° C, 5 s à 55 ° C (à l'exception des GAPDH: 9 ° C)), et 8 s à 72 ° C ont été réalisés.

	Sens	Antisens
Cycline B1 (160 pb)	5'-ACC AAA ATA CCT ACT GGG TCG G-3'	5'-GCA ACC TGA CAG CAA TAA TGG-3'
Déshydrogénase glycéraldéhyde-3-phosphate (GAPDH, 137 pb)	5'-AGC AAT TCC TGC GCC ACC ACC AAC-3'	5'-GCC GAG GGG CCA TCC ACA CGC-3'
Dnmts 1 (144 pb)	5'-AGGACAGGGGACCCACGAAA-3'	5'-ACA TDC CAC AGA CCG CAC AT-3'
Dnmt3a (133 bp)	5'-CAT CAC GGT GGG CAT GGT GCG-3'	5'-GGT AGA CAT TGC AGG GAC TG-3'
UHRF1 (240 pb)	5'- GGG GCT ATG AGG ATG ATG TG-3'	5'-TCT TGC CAC CCT TGA CAT T-3',
Dnmt3b (149 pb)	5'-GAA TAG GGG TGT ACC TCG GG-3'	5'-GGA CCT GAC AGA GAA CTT GC-3'

La mesure de la parasitémie est effectuée par quantification de l'ADN par PCR quantitative en temps réel (LightCycler®, Roche, Meylan, France). L'ADN des cellules infectées ou non est extrait en utilisant le kit QiaMini Kit (Qiagen). Le mélange réactionnel (20 µL) est composé de 5 µL de l'ADN purifié à tester, de 0,5 µM final de chacune des amorces sens (5'-GGA GGA CTG GCA ACC TGG TGT CG-3' et antisens 5'-TTG TTT CAC CCG GAC CGT TTA GCA G-3', de 2 µL de tampon 10x du système LightCycler® FastStart® Master Hybridization Probes (Roche), de 4 mM de MgCl₂, d'1 U d'UDG (Uracil-DNA Glycosylase, Roche) et d'eau Ultra Pure q.s.p. 20 µL. Ce mélange réactionnel est déposé dans un tube

capillaire en verre puis soumis à l'amplification quantitative. La quantification est rendue possible par la comparaison du signal obtenu pour les échantillons à tester avec une gamme de référence. Le programme d'amplification de PCR quantitative est composé d'une étape d'action de l'UDG (élimination des éventuelles contaminations par transfert) pendant 1 minute à température ambiante, d'une activation de la Taq ADN polymérase de 10 minutes à 95°C et de 50 cycles de 10 secondes à 95°C ; 20 secondes à 58°C et 20 secondes à 72°C.

XI. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Les cellules BeWo ont été cultivées dans des boîtes de Pétri puis infectées par *T. gondii* avec un rapport d'infection de 4/1. Le ChIP a été effectué conformément aux recommandations du fabricant (ChIP-IT Express, Active Motif, CA). La fixation des complexes est réalisée en ajoutant le formaldéhyde pendant 10 min. La réaction est arrêtée par addition de glycine. Les cellules sont lavées avec du PBS froid et la récolte se fait par raclage cellulaire. Les culots cellulaires sont ensuite lysés pendant 30 minutes au froid avec du Lysis Buffer, puis transférés dans potter placé dans la glace et lentement broyés. Le culot contenant les noyaux est remis en suspension dans le digestion Buffer pendant 5 minutes à 37°C. La digestion enzymatique est réalisée à 37°C pendant 30 minutes. La réaction est arrêtée par addition d'EDTA. Après centrifugation, le surnageant contenant la chromatine fragmentée est incubé avec les anticorps anti-UHRF1, anti-NF-κB ou anti-actine (comme contrôle négatif) et des billes magnétiques, à 4°C et sous agitation pendant toute la nuit. Les billes sont lavées et incubées avec 100 ml de tampon d'élution à 65°C pendant 2,5 heures. L'ADN est extrait en utilisant le kit de QiaMini (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Les échantillons sont amplifiés par PCR en utilisant des amorces *cycline B1* et TaqDNA la polymérase (Qiagen). Le volume réactionnel de 25 µL contient 5 µL d'ADN purifié, 2,5 µL de PCR Buffer 10x (Qiagen), 2,5 µL de dNTP 2 mM (Invitrogen), 0,15 µL de Hot Start *Taq* Polymérase (Qiagen), 0,5 µL de chaque amorce (20 µM), et de l'eau stérile q.s.p. 25 µL. L'amplification est effectuée dans un thermocycleur (Perkin Elmer 2400) et comprend 35 cycles sont réalisés à 94 ° C pendant 30 s, 55 ° C pendant 30 s, 72 ° C pendant 30 s et une étape finale à 72 ° C pendant 7 min. La présence de l'amplicon est visualisée après coloration au BET après électrophorèse en gel d'agarose 2%.

Les échantillons immunoprécipités avec l'anticorps anti-NF-κB sont analysés en utilisant des amorces *uhrf1*. L'amplification comprend une étape de dénaturation à 95°C pendant 30 s, suivie de 33 cycles (55°C, 30 s puis 72°C, 30 s) et une étape finale à 72 ° C pendant 7 min.

Le tableau ci-dessous reprend les amorces utilisées pour les expériences de ChIP

	Sens	Antisens
Cycline B1	5'-CGC CAA GAA TGG GGG AGT-3'	5'-CCA CAA GAC GAA GAG GGG C-3'
UHRF1	5'-ATC GGG CGA GCC ATC AGG-3'	5'-CGA GGA CCC CAC AGG TGC A-3'

XII. Analyse de la méthylation

Les cellules sont cultivées et infectées en plaques 6 puits. L'ADN est extrait en utilisant le kit QiaMini Kit (Qiagen). La conversion au bisulfite est effectuée à l'aide du kit MethylDetector (Active Motif). L'ADN est ensuite soumis à des amplifications par PCR de la séquence répétitive LINE1 (Long Interspersed Nuclear Element-1), en utilisant des amorces spécifiques pour la séquence méthylée ou pour la séquence non méthylée, à une température de 55°C.

Le tableau ci-dessous reprend les amorces utilisées.

	Sens	Antisens
Séquence méthylée	5'-AAG ATG CTG GAA GAA TAG TAG-3'	5'-CAC STC CTA ATA AAA TAA ACC-3'
Séquence non méthylée	5'-AGA TGG TTG AAT AGG AGT AAT-3'	5'-CAC STC CTA ATA AAA TAA ACC-3'

XIII. Luciférase

Les cellules sont transfectées pendant 24 heures avec 2 µg de plasmid pGL3-UHRF1-Luc puis elles sont infectées. Les cellules sont récoltées avec 250 µL de Bright-Glo luciferase assay Buffer (Promega, Dübendorf). L'activité luciférase est mesurée en utilisant le Bright-Glo luciferase assay system (Promega). Les résultats sont exprimés par rapport à la quantité de protéines (dosées par la méthode du Bradford).

XIV. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le test t de Student. Les données sont présentées correspondent à la moyenne de 3 expériences \pm SEM. Une valeur p inférieure à 0,05 est considérée comme significative.

Liste des figures

Figure 1 :	<i>T. gondii</i> est un parasite eucaryote appartenant au phylum des Apicomplexae	13
Figure 2 :	Oocyste de <i>T. gondii</i>	14
Figure 3 :	Structure d'un tachyzoïte	14
Figure 4 :	Endodyogénie des tachyzoïtes de <i>T. gondii</i>	15
Figure 5 :	Structure d'un bradyzoïte et kyste tissulaire	16
Figure 6 :	Processus d'interconversion	17
Figure 7 :	Organelles de <i>T. gondii</i>	18
Figure 8 :	Modélisation de la jonction mobile	25
Figure 9 :	Invasion de la cellule-hôte par <i>T. gondii</i>	25
Figure 10 :	Sortie du parasite	26
Figure 11 :	Cycle parasitaire de <i>T. gondii</i>	28
Figure 12 :	Prévalence de la toxoplasmose en France	29
Figure 13 :	Risque de transmission materno-fœtale et gravité de l'atteinte de l'enfant en fonction de la mère	32
Figure 14 :	Choriorétinite consécutive à une toxoplasmose congénitale	33
Figure 15 :	Schéma d'acquisition potentielle des nutriments intracellulaires par <i>T. gondii</i>	39
Figure 16 :	Association du réticulum endoplasmique et des mitochondries de la cellule-hôte avec la VP de <i>T. gondii</i>	41
Figure 17 :	Association des mitochondries et de la vacuole parasitophore	42
Figure 18 :	Orientation schématique de GRA3 dans la MVP et de CAMLG dans le réticulum endoplasmique et interaction supposée entre les deux	43
Figure 19 :	Manipulation du cytosquelette et des organelles de la cellule-hôte	44
Figure 20 :	Acquisition du cholestérol	46
Figure 21 :	<i>T. gondii</i> influence l'apoptose de la cellule-hôte	50
Figure 22 :	Modèle représentant la modulation de l'expression de NF-κB dans les cellules infectées	54
Figure 23 :	Modulation de la voie de signalisation de STAT1 par <i>T. gondii</i>	56
Figure 24 :	<i>T.gondii</i> cible le remodelage de la chromatine	64
Figure 25 :	Interactions hôte-parasite	70
Figure 26 :	Structure de la protéine UHRF1	72
Figure 27 :	Le gène d' <i>uhrfl</i>	72
Figure 28 :	Expression d'UHRF1 au cours du cycle cellulaire	73
Figure 29 :	Cycle cellulaire et complexes Cyclines/Cdks	75

Figure 30 :	Régulation de l'activité des Cdks	75
Figure 31 :	La voie pRB/E2F	78
Figure 32 :	Mécanisme d'action proposé d'UHRF1 dans les cellules cancéreuses	80
Figure 33 :	Possibles thérapies moléculaires ciblant UHRF1	82
Figure 34 :	Structure d'un nucléosome et modifications post-traductionnelles possibles sur la queue des histones	83
Figure 35 :	Recrutement de protéines aux histones et domaines utilisés pour la reconnaissance des lysines méthylées, des lysines acétylées ou des sérines phosphorylées	85
Figure 36 :	Structure du domaine SRA	86
Figure 37 :	Représentation du complexe SRA-ADN	86
Figure 38 :	Représentation schématique des interactions protéine-ADN	87
Figure 39 :	Reconnaissance de l'ADN hémi-méthylé par le domaine SRA d'UHRF1	89
Figure 40 :	Modèle d'interférence d'UHRF1 avec la méthylation de l'ADN et les modifications des histones	92
Figure 41 :	Diagramme montrant la répartition par catégorie fonctionnelle des protéines modulées lors de l'infection par <i>T. gondii</i>	100
Figure 42 :	Transition G2/M	102
Figure 43 :	Mécanisme proposé d'association entre la cellule-hôte et <i>T. gondii</i>	105
Figure 44 :	Réorganisation des microtubules dans les cellules infectées par <i>T. gondii</i>	106
Figure 45 :	Activité du promoteur d' <i>uhrf1</i> dans les cellules BeWo infectées par <i>T. gondii</i>	108
Figure 46 :	Mesure de l'expression des protéines et des ARNm d'UHRF1 et de la cycline B dans les cellules BeWo infectées par <i>T. gondii</i>	115
Figure 47 :	Liaison d'UHRF1 sur le promoteur du gène de la <i>cycline B</i>	116
Figure 48 :	Mesure de l'expression de la cycline B dans les cellules BeWo infectées par <i>T. gondii</i> en l'absence d'UHRF1	116
Figure 49 :	Mesure de l'expression des ARNm des Dnmts dans les cellules BeWo infectées par <i>T. gondii</i>	118
Figure 50 :	Méthylation de l'ADN des cellules BeWo infectées par <i>T. gondii</i>	119
Figure 51 :	Ilots CpG du promoteur de la <i>cycline B2</i>	120
Figure 52 :	Liaison d'UHRF1 au promoteur de la <i>cycline B</i> dans les cellules transfectées avec les plasmides Cycline B WT ou Δ CCAAT	121
Figure 53 :	Mécanismes possibles d'inactivation du gène de la <i>cycline B</i> dans les cellules infectées	122
Figure 54 :	Promoteur du gène <i>uhrf1</i> et localisation des sites de liaison potentiels à NF- κ B	126
Figure 55 :	Liaison de NF- κ B au promoteur d' <i>uhrf1</i>	127
Figure 56 :	Séquence du peptide SN50 et plasmide I κ B	128
Figure 57 :	Activité du promoteur d' <i>uhrf1</i> dans les cellules BeWo infectées par <i>T. gondii</i>	129

Figure 58 :	Phosphorylation de la protéine UHRF1 dans les cellules infectées	130
Figure 59 :	Sécrétion des rhoptries	131
Figure 60 :	Etude de l'expression d'UHRF1 dans les cellules BeWo infectées par <i>T. gondii</i> en présence de Cytochalasine D	132
Figure 61	Mutants réalisés de ROP16	133
Figure 62 :	Mutants délétés d'UHRF1	134
Figure 63 :	Modèle proposé d'activation d'UHRF1 dans les cellules infectées par une souche de type I de <i>T. gondii</i> et son implication dans la modulation du cycle cellulaire et la modulation de l'expression du génome des cellules-hôtes	140

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Caractéristiques des différentes souches de <i>T. gondii</i>	22
Tableau 2 :	Activités de la membrane de la vacuole parasitophore de <i>T. gondii</i>	38

BIBLIOGRAPHIE

- Achour M., G. Fuhrmann, M. Alhosin, P. Ronde, T. Chataigneau, M. Mousli, V. B. Schini-Kerth, and C. Bronner.** 2009. UHRF1 recruits the histone acetyltransferase Tip60 and controls its expression and activity. *Biochem Biophys Res Commun* 390:523-528.
- Achour M., X. Jacq, P. Ronde, M. Alhosin, C. Charlot, T. Chataigneau, M. Jeanblanc, M. Macaluso, A. Giordano, A. D. Hughes, V. B. Schini-Kerth, and C. Bronner.** 2008. The interaction of the SRA domain of ICBP90 with a novel domain of DNMT1 is involved in the regulation of VEGF gene expression. *Oncogene* 27:2187-2197.
- AFSSA.** 2005. Toxoplasmose : état des connaissances et &évaluation du risque lié à l'alimentation. *Maison ALFORT*.
- Ahn H. J., S. Kim, and H. W. Nam.** 2005. Host cell binding of GRA10, a novel, constitutively secreted dense granular protein from *Toxoplasma gondii*. *Biochem Biophys Res Commun* 331:614-620.
- Ahn H. J., S. Kim, H. E. Kim, and H. W. Nam.** 2006. Interactions between secreted GRA proteins and host cell proteins across the parasitophorous vacuolar membrane in the parasitism of *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol* 44:303-312.
- Ahn H. J., S. Kim, and H. W. Nam.** 2007. Nucleolar translocation of GRA10 of *Toxoplasma gondii* transfected in HeLa cells. *Korean J Parasitol* 45:165-174.
- Ajzenberg D., A. L. Banuls, M. Tibayrenc, and M. L. Darde.** 2002. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int J Parasitol* 32:27-38.
- Ajzenberg D., H. Yera, P. Marty, L. Paris, F. Dalle, J. Menotti, D. Aubert, J. Franck, M. H. Bessieres, D. Quinio, H. Pelloux, L. Delhaes, N. Desbois, P. Thulliez, F. Robert-Gangneux, C. Kauffmann-Lacroix, S. Pujol, M. Rabodonirina, M. E. Bougnoux, B. Cuisenier, C. Duhamel, T. H. Duong, D. Filisetti, P. Flori, F. Gay-Andrieu, F. Pratlong, G. Nevez, A. Totet, B. Carme, H. Bonnabau, M. L. Darde, and I. Villena.** 2009. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* 199:1155-1167.
- Alexander D. L., J. Mital, G. E. Ward, P. Bradley, and J. C. Boothroyd.** 2005. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog* 1:e17.
- Aliberti J., D. Jankovic, and A. Sher.** 2004. Turning it on and off: regulation of dendritic cell function in *Toxoplasma gondii* infection. *Immunol Rev* 201:26-34.
- Aliberti J., and A. Bafica.** 2005. Anti-inflammatory pathways as a host evasion mechanism for pathogens. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73:283-288.
- Arbibe L., D. W. Kim, E. Batsche, T. Pedron, B. Mateescu, C. Muchardt, C. Parsot, and P. J. Sansonetti.** 2007. An injected bacterial effector targets chromatin access for transcription factor NF-kappaB to alter transcription of host genes involved in immune responses. *Nat Immunol* 8:47-56.
- Arima Y., T. Hirota, C. Bronner, M. Mousli, T. Fujiwara, S. Niwa, H. Ishikawa, and H. Saya.** 2004. Down-regulation of nuclear protein ICBP90 by p53/p21Cip1/WAF1-dependent DNA-damage checkpoint signals contributes to cell cycle arrest at G1/S transition. *Genes Cells* 9:131-142.
- Arita K., M. Ariyoshi, H. Tochio, Y. Nakamura, and M. Shirakawa.** 2008. Recognition of hemi-methylated DNA by the SRA protein UHRF1 by a base-flipping mechanism. *Nature* 455:818-821.

- Arling T. A., R. H. Yolken, M. Lapidus, P. Langenberg, F. B. Dickerson, S. A. Zimmerman, T. Balis, J. A. Cabassa, D. A. Scrandis, L. H. Tonelli, and T. T. Postolache.** 2009. *Toxoplasma gondii* antibody titers and history of suicide attempts in patients with recurrent mood disorders. *J Nerv Ment Dis* 197:905-908.
- Arrais-Silva W. W., V. A. Paffaro, Jr., A. T. Yamada, and S. Giorgio.** 2005. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in the cutaneous lesions of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Exp Mol Pathol* 78:49-54.
- Aspinall T. V., E. C. Guy, K. E. Roberts, D. H. Joynson, J. E. Hyde, and P. F. Sims.** 2003. Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. *Int J Parasitol* 33:97-103.
- Aspinall T. V., D. H. Joynson, E. Guy, J. E. Hyde, and P. F. Sims.** 2002. The molecular basis of sulfonamide resistance in *Toxoplasma gondii* and implications for the clinical management of toxoplasmosis. *J Infect Dis* 185:1637-1643.
- Avvakumov G. V., J. R. Walker, S. Xue, Y. Li, S. Duan, C. Bronner, C. H. Arrowsmith, and S. Dhe-Paganon.** 2008. Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. *Nature* 455:822-825.
- Baatz H., A. Mirshahi, J. Puchta, H. Gumbel, and L. O. Hattenbach.** 2006. Reactivation of *toxoplasma* retinochoroiditis under atovaquone therapy in an immunocompetent patient. *Ocul Immunol Inflamm* 14:185-187.
- Baeuerle P. A., and T. Henkel.** 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12:141-179.
- Baum J., A. T. Papenfuss, B. Baum, T. P. Speed, and A. F. Cowman.** 2006. Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nat Rev Microbiol* 4:621-628.
- Beckers C. J., J. F. Dubremetz, O. Mercereau-Puijalon, and K. A. Joiner.** 1994. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J Cell Biol* 127:947-961.
- Berdoy M., J. P. Webster, and D. W. Macdonald.** 2000. Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proc Biol Sci* 267:1591-1594.
- Bhatti M. M., M. Livingston, N. Mullapudi, and W. J. Sullivan, Jr.** 2006. Pair of unusual GCN5 histone acetyltransferases and ADA2 homologues in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell* 5:62-76.
- Biniszkiwicz D., J. Gribnau, B. Ramsahoye, F. Gaudet, K. Eggen, D. Humpherys, M. A. Mastrangelo, Z. Jun, J. Walter, and R. Jaenisch.** 2002. Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 22:2124-2135.
- Black M. W., and J. C. Boothroyd.** 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:607-623.
- Blader I. J., I. D. Manger, and J. C. Boothroyd.** 2001. Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. *J Biol Chem* 276:24223-24231.
- Blader I. J., and J. P. Saeij.** 2009. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS* 117:458-476.
- Blume-Jensen P., R. Janknecht, and T. Hunter.** 1998. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol* 8:779-782.
- Boothroyd J. C., and J. F. Dubremetz.** 2008. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol* 6:79-88.

- Bostick M., J. K. Kim, P. O. Esteve, A. Clark, S. Pradhan, and S. E. Jacobsen.** 2007. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 317:1760-1764.
- Bougdour A., L. Braun, D. Cannella, and M. A. Hakimi.** 2010. Chromatin modifications: implications in the regulation of gene expression in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.*
- Bowie W. R., A. S. King, D. H. Werker, J. L. Isaac-Renton, A. Bell, S. B. Eng, and S. A. Marion.** 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team. *Lancet* 350:173-177.
- Bradley P. J., C. Ward, S. J. Cheng, D. L. Alexander, S. Coller, G. H. Coombs, J. D. Dunn, D. J. Ferguson, S. J. Sanderson, J. M. Wastling, and J. C. Boothroyd.** 2005. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 280:34245-34258.
- Brecht S., V. B. Carruthers, D. J. Ferguson, O. K. Giddings, G. Wang, U. Jakle, J. M. Harper, L. D. Sibley, and D. Soldati.** 2001. The toxoplasma micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains. *J Biol Chem* 276:4119-4127.
- Bromberg J., and J. E. Darnell, Jr.** 2000. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19:2468-2473.
- Bronner C., M. A. Trotzier, O. Filhol, C. Cochet, C. Rochette-Egly, M. Scholler-Guinard, J. P. Klein, and M. Mousli.** 2004. The antiapoptotic protein ICBP90 is a target for protein kinase 2. *Ann N Y Acad Sci* 1030:355-360.
- Bronner C., M. Achour, Y. Arima, T. Chataigneau, H. Saya, and V. B. Schini-Kerth.** 2007. The UHRF family: oncogenes that are drugable targets for cancer therapy in the near future? *Pharmacol Ther* 115:419-434.
- Brunet J., A. W. Pfaff, A. Abidi, M. Unoki, Y. Nakamura, M. Guinard, J. P. Klein, E. Candolfi, and M. Mousli.** 2008. *Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation. *Cell Microbiol* 10:908-920.
- Butcher B. A., L. Kim, P. F. Johnson, and E. Y. Denkers.** 2001. *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. *J Immunol* 167:2193-2201.
- Butcher B. A., L. Kim, A. D. Panopoulos, S. S. Watowich, P. J. Murray, and E. Y. Denkers.** 2005. IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. *J Immunol* 174:3148-3152.
- Buxton D., and E. A. Innes.** 1995. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology* 110 Suppl:S11-16.
- Buxton D.** 1998. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis spp.*) in sheep and goats: recent advances. *Vet Res* 29:289-310.
- Caamano J., J. Alexander, L. Craig, R. Bravo, and C. A. Hunter.** 1999. The NF-kappa B family member RelB is required for innate and adaptive immunity to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 163:4453-4461.
- Caamano J., C. Tato, G. Cai, E. N. Villegas, K. Speirs, L. Craig, J. Alexander, and C. A. Hunter.** 2000. Identification of a role for NF-kappa B2 in the regulation of apoptosis and in maintenance of T cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 165:5720-5728.
- Carey K. L., A. M. Jongco, K. Kim, and G. E. Ward.** 2004. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells. *Eukaryot Cell* 3:1320-1330.
- Carmen J. C., L. Hardi, and A. P. Sinai.** 2006. *Toxoplasma gondii* inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. *Cell Microbiol* 8:301-315.

- Carruthers V. B., and L. D. Sibley.** 1999. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol* 31:421-428.
- Carruthers V. B.** 2002. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop* 81:111-122.
- Carruthers V., and J. C. Boothroyd.** 2007. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr Opin Microbiol* 10:83-89.
- Cerede O., J. F. Dubremetz, M. Soete, D. Deslee, H. Vial, D. Bout, and M. Lebrun.** 2005. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *J Exp Med* 201:453-463.
- Cesbron-Delauw M. F.** 1994. Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today* 10:293-296.
- Chai Z., B. Sarcevic, A. Mawson, and B. H. Toh.** 2001. SET-related cell division autoantigen-1 (CDA1) arrests cell growth. *J Biol Chem* 276:33665-33674.
- Charron A. J., and L. D. Sibley.** 2002. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 115:3049-3059.
- Charron A. J., and L. D. Sibley.** 2004. Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic* 5:855-867.
- Chaudhary K., J. A. Darling, L. M. Fohl, W. J. Sullivan, Jr., R. G. Donald, E. R. Pfefferkorn, B. Ullman, and D. S. Roos.** 2004. Purine salvage pathways in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 279:31221-31227.
- Chen G., L. Shi, D. W. Litchfield, and A. H. Greenberg.** 1995. Rescue from granzyme B-induced apoptosis by Wee1 kinase. *J Exp Med* 181:2295-2300.
- Cheng A., K. E. Ross, P. Kaldis, and M. J. Solomon.** 1999. Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes Dev* 13:2946-2957.
- Cherrier T., S. Suzanne, L. Redel, M. Calao, C. Marban, B. Samah, R. Mukerjee, C. Schwartz, G. Gras, B. E. Sawaya, S. L. Zeichner, D. Aunis, C. Van Lint, and O. Rohr.** 2009. p21(WAF1) gene promoter is epigenetically silenced by CTIP2 and SUV39H1. *Oncogene* 28:3380-3389.
- Chin R., U. Nachbur, L. Earnest-Silveira, A. Bankovacki, B. Koeberlein, H. Zentgraf, C. T. Bock, J. Silke, and J. Torresi.** 2010. Dysregulation of hepatocyte cell cycle and cell viability by hepatitis B virus. *Virus Res* 147:7-16.
- Chowdhury I. H., X. F. Wang, N. R. Landau, M. L. Robb, V. R. Polonis, D. L. Birx, and J. H. Kim.** 2003. HIV-1 Vpr activates cell cycle inhibitor p21/Waf1/Cip1: a potential mechanism of G2/M cell cycle arrest. *Virology* 305:371-377.
- Cokus S. J., S. Feng, X. Zhang, Z. Chen, B. Merriman, C. D. Haudenschild, S. Pradhan, S. F. Nelson, M. Pellegrini, and S. E. Jacobsen.** 2008. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* 452:215-219.
- Conrad P. A., M. A. Miller, C. Kreuder, E. R. James, J. Mazet, H. Dabritz, D. A. Jessup, F. Gulland, and M. E. Grigg.** 2005. Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *Int J Parasitol* 35:1155-1168.
- Coppens I., A. P. Sinai, and K. A. Joiner.** 2000. *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J Cell Biol* 149:167-180.
- Coppens I., and K. A. Joiner.** 2001. Parasite-host cell interactions in toxoplasmosis: new avenues for intervention? *Expert Rev Mol Med* 2001:1-20.
- Coppens I., and K. A. Joiner.** 2003. Host but not parasite cholesterol controls *Toxoplasma* cell entry by modulating organelle discharge. *Mol Biol Cell* 14:3804-3820.

- Coppens I., J. D. Dunn, J. D. Romano, M. Pypaert, H. Zhang, J. C. Boothroyd, and K. A. Joiner.** 2006. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* 125:261-274.
- Coppens I., J. D. Dunn, J. D. Romano, M. Pypaert, H. Zhang, J. C. Boothroyd, and K. A. Joiner.** 2006. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* 125:261-274.
- Crawford M. J., N. Thomsen-Zieger, M. Ray, J. Schachtner, D. S. Roos, and F. Seeber.** 2006. *Toxoplasma gondii* scavenges host-derived lipoic acid despite its de novo synthesis in the apicoplast. *EMBO J* 25:3214-3222.
- Crnogorac-Jurcevic T., R. Gangeswaran, V. Bhakta, G. Capurso, S. Lattimore, M. Akada, M. Sunamura, W. Prime, F. Campbell, T. A. Brentnall, E. Costello, J. Neoptolemos, and N. R. Lemoine.** 2005. Proteomic analysis of chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 129:1454-1463.
- Dantzer R., J. C. O'Connor, G. G. Freund, R. W. Johnson, and K. W. Kelley.** 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9:46-56.
- Darde M. L., B. Bouteille, and M. Pestre-Alexandre.** 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J Parasitol* 78:786-794.
- Datta S. R., A. Brunet, and M. E. Greenberg.** 1999. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev* 13:2905-2927.
- De Smedt V., R. Poulhe, X. Cayla, F. Dessauge, A. Karaiskou, C. Jesus, and R. Ozon.** 2002. Thr-161 phosphorylation of monomeric Cdc2. Regulation by protein phosphatase 2C in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 277:28592-28600.
- Debierre-Grockiego F., M. A. Campos, N. Azzouz, J. Schmidt, U. Bieker, M. G. Resende, D. S. Mansur, R. Weingart, R. R. Schmidt, D. T. Golenbock, R. T. Gazzinelli, and R. T. Schwarz.** 2007. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 179:1129-1137.
- Delorme V., X. Cayla, G. Faure, A. Garcia, and I. Tardieux.** 2003. Actin dynamics is controlled by a casein kinase II and phosphatase 2C interplay on *Toxoplasma gondii* Toxofilin. *Mol Biol Cell* 14:1900-1912.
- Denkers E. Y., and R. T. Gazzinelli.** 1998. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* 11:569-588.
- Denkers E. Y., L. Kim, and B. A. Butcher.** 2003. In the belly of the beast: subversion of macrophage proinflammatory signalling cascades during *Toxoplasma gondii* infection. *Cell Microbiol* 5:75-83.
- Derouin F.** 2001. Anti-toxoplasmosis drugs. *Curr Opin Investig Drugs* 2:1368-1374.
- Dimier I. H., and D. T. Bout.** 1998. Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication: a role for intracellular iron. *Immunology* 94:488-495.
- Dobbelaere D. A., and S. Rottenberg.** 2003. *Theileria*-induced leukocyte transformation. *Curr Opin Microbiol* 6:377-382.
- Dobbin C. A., N. C. Smith, and A. M. Johnson.** 2002. Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine toxoplasma infection via immunomodulation of host NF-kappa B and nitric oxide. *J Immunol* 169:958-965.
- Dobrowolski J. M., and L. D. Sibley.** 1996. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* 84:933-939.
- Dubey J. P., D. S. Lindsay, and C. A. Speer.** 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 11:267-299.

- Dziadek B., J. Dziadek, and H. Dlugonska.** 2007. Identification of *Toxoplasma gondii* proteins binding human lactoferrin: a new aspect of rhoptry proteins function. *Exp Parasitol* 115:277-282.
- Earnshaw W. C., L. M. Martins, and S. H. Kaufmann.** 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68:383-424.
- El Hajj H., E. Demey, J. Poncet, M. Lebrun, B. Wu, N. Galeotti, M. N. Fourmaux, O. Mercereau-Puijalon, H. Vial, G. Labesse, and J. F. Dubremetz.** 2006. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics* 6:5773-5784.
- El Hajj H., M. Lebrun, S. T. Arold, H. Vial, G. Labesse, and J. F. Dubremetz.** 2007. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* 3:e14.
- El Hajj H., M. Lebrun, M. N. Fourmaux, H. Vial, and J. F. Dubremetz.** 2007. Inverted topology of the *Toxoplasma gondii* ROP5 rhoptry protein provides new insights into the association of the ROP2 protein family with the parasitophorous vacuole membrane. *Cell Microbiol* 9:54-64.
- Elder R. T., M. Yu, M. Chen, S. Edelson, and Y. Zhao.** 2000. Cell cycle G2 arrest induced by HIV-1 Vpr in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) is independent of cell death and early genes in the DNA damage checkpoint. *Virus Res* 68:161-173.
- Elder R. T., M. Yu, M. Chen, X. Zhu, M. Yanagida, and Y. Zhao.** 2001. HIV-1 Vpr induces cell cycle G2 arrest in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) through a pathway involving regulatory and catalytic subunits of PP2A and acting on both Wee1 and Cdc25. *Virology* 287:359-370.
- Estes R., N. Vogel, D. Mack, and R. McLeod.** 1998. Paclitaxel arrests growth of intracellular *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 42:2036-2040.
- Fang Z., F. Xing, C. Bronner, Z. Teng, and Z. Guo.** 2009. ICBP90 mediates the ERK1/2 signaling to regulate the proliferation of Jurkat T cells. *Cell Immunol* 257:80-87.
- Flegr J.** 2007. Effects of *toxoplasma* on human behavior. *Schizophr Bull* 33:757-760.
- Foussard F., M. A. Leriche, and J. F. Dubremetz.** 1991. Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. *Parasitology* 102 Pt 3:367-370.
- Fox B. A., J. P. Gigley, and D. J. Bzik.** 2004. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Int J Parasitol* 34:323-331.
- Fuentes I., J. M. Rubio, C. Ramirez, and J. Alvar.** 2001. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol* 39:1566-1570.
- Gail M., U. Gross, and W. Bohne.** 2001. Transcriptional profile of *Toxoplasma gondii*-infected human fibroblasts as revealed by gene-array hybridization. *Mol Genet Genomics* 265:905-912.
- Gail M., U. Gross, and W. Bohne.** 2004. Transferrin receptor induction in *Toxoplasma gondii*-infected HFF is associated with increased iron-responsive protein 1 activity and is mediated by secreted factors. *Parasitol Res* 94:233-239.
- Garcia-Reguet N., M. Lebrun, M. N. Fourmaux, O. Mercereau-Puijalon, T. Mann, C. J. Beckers, B. Samyn, J. Van Beeumen, D. Bout, and J. F. Dubremetz.** 2000. The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. *Cell Microbiol* 2:353-364.
- Gavrilescu L. C., and E. Y. Denkers.** 2001. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol* 167:902-909.

- Gazzinelli R. T., M. Wysocka, S. Hieny, T. Scharon-Kersten, A. Cheever, R. Kuhn, W. Muller, G. Trinchieri, and A. Sher.** 1996. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 157:798-805.
- Ghosh S., M. J. May, and E. B. Kopp.** 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:225-260.
- Ghosh S., and M. Karin.** 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl:S81-96.
- Gilbert L. A., S. Ravindran, J. M. Turetzky, J. C. Boothroyd, and P. J. Bradley.** 2007. *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. *Eukaryot Cell* 6:73-83.
- Gissot M., S. W. Choi, R. F. Thompson, J. M. Grealley, and K. Kim.** 2008. *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum* lack detectable DNA cytosine methylation. *Eukaryot Cell* 7:537-540.
- Goebel S., U. Gross, and C. G. Luder.** 2001. Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression. *J Cell Sci* 114:3495-3505.
- Goldszmid R. S., I. Coppens, A. Lev, P. Caspar, I. Mellman, and A. Sher.** 2009. Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells. *J Exp Med* 206:399-410.
- Goll M. G., and T. H. Bestor.** 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74:481-514.
- Grigg M. E., J. Ganatra, J. C. Boothroyd, and T. P. Margolis.** 2001. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis* 184:633-639.
- Grimwood J., J. R. Mineo, and L. H. Kasper.** 1996. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells is host cell cycle dependent. *Infect Immun* 64:4099-4104.
- Guergnon J., M. Chaussepied, P. Sopp, R. Lizundia, M. F. Moreau, B. Blumen, D. Werling, C. J. Howard, and G. Langsley.** 2003. A tumour necrosis factor alpha autocrine loop contributes to proliferation and nuclear factor-kappaB activation of *Theileria parva*-transformed B cells. *Cell Microbiol* 5:709-716.
- Gupta N., M. M. Zahn, I. Coppens, K. A. Joiner, and D. R. Voelker.** 2005. Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* arrests its growth. *J Biol Chem* 280:16345-16353.
- Hakansson S., A. J. Charron, and L. D. Sibley.** 2001. *Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J* 20:3132-3144.
- Hakimi M. A., and K. W. Deitsch.** 2007. Epigenetics in Apicomplexa: control of gene expression during cell cycle progression, differentiation and antigenic variation. *Curr Opin Microbiol* 10:357-362.
- Halonen S. K., and E. Weidner.** 1994. Overcoating of *Toxoplasma* parasitophorous vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments. *J Eukaryot Microbiol* 41:65-71.
- Hamon M. A., E. Batsche, B. Regnault, T. N. Tham, S. Seveau, C. Muchardt, and P. Cossart.** 2007. Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13467-13472.
- Hamon M. A., and P. Cossart.** 2008. Histone modifications and chromatin remodeling during bacterial infections. *Cell Host Microbe* 4:100-109.
- Harbour J. W., and D. C. Dean.** 2000. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 14:2393-2409.

- Harbour J. W., and D. C. Dean.** 2000. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2:E65-67.
- Hashimoto H., J. R. Horton, X. Zhang, M. Bostick, S. E. Jacobsen, and X. Cheng.** 2008. The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix. *Nature* 455:826-829.
- Hashimoto H., J. R. Horton, X. Zhang, and X. Cheng.** 2009. UHRF1, a modular multi-domain protein, regulates replication-coupled crosstalk between DNA methylation and histone modifications. *Epigenetics* 4:8-14.
- He J., S. Choe, R. Walker, P. Di Marzio, D. O. Morgan, and N. R. Landau.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol* 69:6705-6711.
- Hellwig-Burgel T., K. Rutkowski, E. Metzen, J. Fandrey, and W. Jelkmann.** 1999. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 94:1561-1567.
- Heussler V. T., S. Rottenberg, R. Schwab, P. Kuenzi, P. C. Fernandez, S. McKellar, B. Shiels, Z. J. Chen, K. Orth, D. Wallach, and D. A. Dobbelaere.** 2002. Hijacking of host cell IKK signalosomes by the transforming parasite *Theileria*. *Science* 298:1033-1036.
- Holliman R. E.** 1997. Toxoplasmosis, behaviour and personality. *J Infect* 35:105-110.
- Honore S., A. Couvelard, Y. J. Garin, C. Bedel, D. Henin, M. L. Darde, and F. Derouin.** 2000. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients. *Pathol Biol (Paris)* 48:541-547..
- Hopfner R., M. Mousli, J. M. Jeltsch, A. Voulgaris, Y. Lutz, C. Marin, J. P. Bellocq, P. Oudet, and C. Bronner.** 2000. ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase IIalpha expression. *Cancer Res* 60:121-128.
- Hopfner R., M. Mousli, J. M. Garnier, R. Redon, S. du Manoir, B. Chatton, N. Ghyselinck, P. Oudet, and C. Bronner.** 2001. Genomic structure and chromosomal mapping of the gene coding for ICBP90, a protein involved in the regulation of the topoisomerase IIalpha gene expression. *Gene* 266:15-23
- Howe D. K., and L. D. Sibley.** 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 172:1561-1566.
- Howe D. K., S. Honore, F. Derouin, and L. D. Sibley.** 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 35:1411-1414.
- Hu K., T. Mann, B. Striepen, C. J. Beckers, D. S. Roos, and J. M. Murray.** 2002. Daughter cell assembly in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Biol Cell* 13:593-606.
- Huang L. E., Z. Arany, D. M. Livingston, and H. F. Bunn.** 1996. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 271:32253-32259.
- Hussain S. P., and C. C. Harris.** 2000. Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. *Mutat Res* 462:311-322.
- Ikura T., V. V. Ogryzko, M. Grigoriev, R. Groisman, J. Wang, M. Horikoshi, R. Scully, J. Qin, and Y. Nakatani.** 2000. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* 102:463-473.
- Irizarry R. A., C. Ladd-Acosta, B. Wen, Z. Wu, C. Montano, P. Onyango, H. Cui, K. Gabo, M. Rongione, M. Webster, H. Ji, J. B. Potash, S. Sabunciyan, and A. P. Feinberg.** 2009. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* 41:178-186.

- Iyer L. M., V. Anantharaman, M. Y. Wolf, and L. Aravind.** 2008. Comparative genomics of transcription factors and chromatin proteins in parasitic protists and other eukaryotes. *Int J Parasitol* 38:1-31.
- Jackson-Grusby L., C. Beard, R. Possemato, M. Tudor, D. Fambrough, G. Csankovszki, J. Dausman, P. Lee, C. Wilson, E. Lander, and R. Jaenisch.** 2001. Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet* 27:31-39.
- Jeanblanc M., M. Mousli, R. Hopfner, K. Bathami, N. Martinet, A. Q. Abbady, J. C. Siffert, E. Mathieu, C. D. Muller, and C. Bronner.** 2005. The retinoblastoma gene and its product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G1/S transition during the cell cycle. *Oncogene* 24:7337-7345.
- Jenkins Y., V. Markovtsov, W. Lang, P. Sharma, D. Pearsall, J. Warner, C. Franci, B. Huang, J. Huang, G. C. Yam, J. P. Vistan, E. Pali, J. Vialard, M. Janicot, J. B. Lorens, D. G. Payan, and Y. Hitoshi.** 2005. Critical role of the ubiquitin ligase activity of UHRF1, a nuclear RING finger protein, in tumor cell growth. *Mol Biol Cell* 16:5621-5629.
- Jin W., L. Chen, Y. Chen, S. G. Xu, G. H. Di, W. J. Yin, J. Wu, and Z. M. Shao.** 2009. UHRF1 is associated with epigenetic silencing of BRCA1 in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.*
- Joiner K. A., and D. S. Roos.** 2002. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J Cell Biol* 157:557-563.
- Jones J. L., D. Kruszon-Moran, M. Wilson, G. McQuillan, T. Navin, and J. B. McAuley.** 2001. *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. *Am J Epidemiol* 154:357-365.
- Kar N., and B. Misra.** 2004. *Toxoplasma* seropositivity and depression: a case report. *BMC Psychiatry* 4:1.
- Karagianni P., L. Amazit, J. Qin, and J. Wong.** 2008. ICBP90, a novel methyl K9 H3 binding protein linking protein ubiquitination with heterochromatin formation. *Mol Cell Biol* 28:705-717.
- Karin M., and A. Lin.** 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3:221-227.
- Kaufmann S. H.** 1997. Resistance to topoisomerase II poisons: is the answer in the promoter? *Leuk Res* 21:1033-1036.
- Keller P., F. Schaumburg, S. F. Fischer, G. Hacker, U. Gross, and C. G. Luder.** 2006. Direct inhibition of cytochrome c-induced caspase activation in vitro by *Toxoplasma gondii* reveals novel mechanisms of interference with host cell apoptosis. *FEMS Microbiol Lett* 258:312-319.
- Kieschnick H., T. Wakefield, C. A. Narducci, and C. Beckers.** 2001. *Toxoplasma gondii* attachment to host cells is regulated by a calmodulin-like domain protein kinase. *J Biol Chem* 276:12369-12377.
- Kim J. M., Y. K. Oh, Y. J. Kim, S. J. Cho, M. H. Ahn, and Y. J. Cho.** 2001. Nuclear factor-kappa B plays a major role in the regulation of chemokine expression of HeLa cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. *Parasitol Res* 87:758-763.
- Kim L., B. A. Butcher, and E. Y. Denkers.** 2004. *Toxoplasma gondii* interferes with lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase activation by mechanisms distinct from endotoxin tolerance. *J Immunol* 172:3003-3010.
- Kim L., B. A. Butcher, C. W. Lee, S. Uematsu, S. Akira, and E. Y. Denkers.** 2006. *Toxoplasma gondii* genotype determines MyD88-dependent signaling in infected macrophages. *J Immunol* 177:2584-2591.

- Kim L., and E. Y. Denkers.** 2006. *Toxoplasma gondii* triggers Gi-dependent PI 3-kinase signaling required for inhibition of host cell apoptosis. *J Cell Sci* 119:2119-2126.
- Kim S. K., A. E. Fouts, and J. C. Boothroyd.** 2007. *Toxoplasma gondii* dysregulates IFN-gamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling. *J Immunol* 178:5154-5165.
- Kim J. Y., H. J. Ahn, K. J. Ryu, and H. W. Nam.** 2008. Interaction between parasitophorous vacuolar membrane-associated GRA3 and calcium modulating ligand of host cell endoplasmic reticulum in the parasitism of *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol* 46:209-216.
- Kim J. K., P. O. Esteve, S. E. Jacobsen, and S. Pradhan.** 2009. UHRF1 binds G9a and participates in p21 transcriptional regulation in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 37:493-505.
- Kimura A., and M. Horikoshi.** 1998. Tip60 acetylates six lysines of a specific class in core histones in vitro. *Genes Cells* 3:789-800.
- Korbel D. S., O. C. Finney, and E. M. Riley.** 2004. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *Int J Parasitol* 34:1517-1528.
- Kouzarides T.** 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693-705.
- Kuzmenok O. I., S. C. Chiang, Y. C. Lin, and S. T. Lee.** 2005. Retardation of cell cycle progression of macrophages from G1 to S phase by ICAM-L from *Leishmania*. *Int J Parasitol* 35:1547-1555.
- Laliberte J., and V. B. Carruthers.** 2008. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci* 65:1900-1915.
- Lang C., M. Algnier, N. Beinert, U. Gross, and C. G. Luder.** 2006. Diverse mechanisms employed by *Toxoplasma gondii* to inhibit IFN-gamma-induced major histocompatibility complex class II gene expression. *Microbes Infect* 8:1994-2005.
- Laughner E., P. Taghavi, K. Chiles, P. C. Mahon, and G. L. Semenza.** 2001. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 21:3995-4004.
- Lavine M. D., and G. Arrizabalaga.** 2007. Invasion and egress by the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*: potential targets for the development of new antiparasitic drugs. *Curr Pharm Des* 13:641-651.
- Lavine M. D., and G. Arrizabalaga.** 2008. Exit from host cells by the pathogenic parasite *Toxoplasma gondii* does not require motility. *Eukaryot Cell* 7:131-140.
- Lebrun M., A. Michelin, H. El Hajj, J. Poncet, P. J. Bradley, H. Vial, and J. F. Dubremetz.** 2005. The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell Microbiol* 7:1823-1833.
- Lee C. W., S. Bennouna, and E. Y. Denkers.** 2006. Screening for *Toxoplasma gondii*-regulated transcriptional responses in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Infect Immun* 74:1916-1923.
- Lekutis C., D. J. Ferguson, M. E. Grigg, M. Camps, and J. C. Boothroyd.** 2001. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int J Parasitol* 31:1285-1292.
- Leng J., B. A. Butcher, and E. Y. Denkers.** 2009. Dysregulation of macrophage signal transduction by *Toxoplasma gondii*: past progress and recent advances. *Parasite Immunol* 31:717-728.
- Leng J., B. A. Butcher, C. E. Egan, D. S. Abdallah, and E. Y. Denkers.** 2009. *Toxoplasma gondii* prevents chromatin remodeling initiated by TLR-triggered macrophage activation. *J Immunol* 182:489-497.
- Leng J., and E. Y. Denkers.** 2009. *Toxoplasma gondii* inhibits covalent modification of histone H3 at the IL-10 promoter in infected macrophages. *PLoS One* 4:e7589.

- Li E., T. H. Bestor, and R. Jaenisch.** 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915-926.
- Li E., C. Beard, and R. Jaenisch.** 1993. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366:362-365.
- Li H., H. Zhu, C. J. Xu, and J. Yuan.** 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.
- Lin Y. Z., S. Y. Yao, R. A. Veach, T. R. Torgerson, and J. Hawiger.** 1995. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* 270:14255-14258.
- Lyko F., B. H. Ramsahoye, H. Kashevsky, M. Tudor, M. A. Mastrangelo, T. L. Orr-Weaver, and R. Jaenisch.** 1999. Mammalian (cytosine-5) methyltransferases cause genomic DNA methylation and lethality in *Drosophila*. *Nat Genet* 23:363-366.
- Lyons R. E., R. McLeod, and C. W. Roberts.** 2002. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol* 18:198-201.
- Martin A. M., T. Liu, B. C. Lynn, and A. P. Sinai.** 2007. The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border. *J Eukaryot Microbiol* 54:25-28.
- Massimine K. M., L. T. Doan, C. A. Atreya, T. T. Stedman, K. S. Anderson, K. A. Joiner, and I. Coppens.** 2005. *Toxoplasma gondii* is capable of exogenous folate transport. A likely expansion of the BT1 family of transmembrane proteins. *Mol Biochem Parasitol* 144:44-54.
- McFadden G. I., M. E. Reith, J. Munholland, and N. Lang-Unnasch.** 1996. Plastid in human parasites. *Nature* 381:482.
- Meilinger D., K. Fellinger, S. Bultmann, U. Rothbauer, I. M. Bonapace, W. E. Klinkert, F. Spada, and H. Leonhardt.** 2009. Np95 interacts with de novo DNA methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b, and mediates epigenetic silencing of the viral CMV promoter in embryonic stem cells. *EMBO Rep* 10:1259-1264.
- Mercier C., D. K. Howe, D. Mordue, M. Lingnau, and L. D. Sibley.** 1998. Targeted disruption of the GRA2 locus in *Toxoplasma gondii* decreases acute virulence in mice. *Infect Immun* 66:4176-4182.
- Mercier C., K. D. Adjogble, W. Daubener, and M. F. Delauw.** 2005. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol* 35:829-849.
- Michelin A., A. Bittame, Y. Bordat, L. Travier, C. Mercier, J. F. Dubremetz, and M. Lebrun.** 2009. GRA12, a *Toxoplasma* dense granule protein associated with the intravacuolar membranous nanotubular network. *Int J Parasitol* 39:299-306.
- Miman O., O. Y. Kusbeci, O. C. Aktepe, and Z. Cetinkaya.** 1997. The probable relation between *Toxoplasma gondii* and Parkinson's disease. *Neurosci Lett*.
- Mital J., M. Meissner, D. Soldati, and G. E. Ward.** 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* 16:4341-4349.
- Molestina R. E., T. M. Payne, I. Coppens, and A. P. Sinai.** 2003. Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated I kappa B to the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Sci* 116:4359-4371.
- Molestina R. E., and A. P. Sinai.** 2005. Detection of a novel parasite kinase activity at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane capable of phosphorylating host I kappa B alpha. *Cell Microbiol* 7:351-362.

- Molestina R. E., and A. P. Sinai.** 2005. Host and parasite-derived IKK activities direct distinct temporal phases of NF-kappaB activation and target gene expression following *Toxoplasma gondii* infection. *J Cell Sci* 118:5785-5796.
- Molestina R. E., N. El-Guendy, and A. P. Sinai.** 2008. Infection with *Toxoplasma gondii* results in dysregulation of the host cell cycle. *Cell Microbiol* 10:1153-1165.
- Montoya J. G., and O. Liesenfeld.** 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363:1965-1976.
- Mordue D. G., S. Hakansson, I. Niesman, and L. D. Sibley.** 1999. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp Parasitol* 92:87-99.
- Mordue D. G., F. Monroy, M. La Regina, C. A. Dinarello, and L. D. Sibley.** 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol* 167:4574-4584.
- Moreilhon C., D. Gras, C. Hologne, O. Bajolet, F. Cottrez, V. Magnone, M. Merten, H. Groux, E. Puchelle, and P. Barbry.** 2005. Live *Staphylococcus aureus* and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells. *Physiol Genomics* 20:244-255.
- Mortensen P. B., B. Norgaard-Pedersen, B. L. Waltoft, T. L. Sorensen, D. Hougaard, and R. H. Yolken.** 2007. Early infections of *Toxoplasma gondii* and the later development of schizophrenia. *Schizophr Bull* 33:741-744.
- Mousli M., R. Hopfner, A. Q. Abbady, D. Monte, M. Jeanblanc, P. Oudet, B. Louis, and C. Bronner.** 2003. ICBP90 belongs to a new family of proteins with an expression that is deregulated in cancer cells. *Br J Cancer* 89:120-127.
- Nagamune K., and L. D. Sibley.** 2006. Comparative genomic and phylogenetic analyses of calcium ATPases and calcium-regulated proteins in the apicomplexa. *Mol Biol Evol* 23:1613-1627.
- Nakaar V., H. M. Ngo, E. P. Aaronson, I. Coppens, T. T. Stedman, and K. A. Joiner.** 2003. Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhopty protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 116:2311-2320.
- Nakahara T., A. Nishimura, M. Tanaka, T. Ueno, A. Ishimoto, and H. Sakai.** 2002. Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4. *J Virol* 76:10914-10920.
- Nash P. B., M. B. Purner, R. P. Leon, P. Clarke, R. C. Duke, and T. J. Curiel.** 1998. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J Immunol* 160:1824-1830.
- Nelson M. M., A. R. Jones, J. C. Carmen, A. P. Sinai, R. Burchmore, and J. M. Wastling.** 2008. Modulation of the host cell proteome by the intracellular apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 76:828-844.
- Nichols B. A., M. L. Chiappino, and G. R. O'Connor.** 1983. Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J Ultrastruct Res* 83:85-98.
- Nishi M., K. Hu, J. M. Murray, and D. S. Roos.** 2008. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 121:1559-1568.
- Nishioka W. K., and R. M. Welsh.** 1994. Susceptibility to cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis is a function of the proliferative status of the target. *J Exp Med* 179:769-774.
- Nussenblatt, R. B., and R. Belfort, Jr.** 1994. Ocular toxoplasmosis. An old disease revisited. *JAMA* 271:304-307.
- Oba-Shinjo S. M., M. H. Bengtson, S. M. Winnischofer, C. Colin, C. G. Vedoy, Z. de Mendonca, S. K. Marie, and M. C. Sogayar.** 2005. Identification of novel differentially expressed genes in human astrocytomas by cDNA representational difference analysis. *Brain Res Mol Brain Res* 140:25-33.

- Ofek P., D. Ben-Meir, Z. Kariv-Inbal, M. Oren, and S. Lavi.** 2003. Cell cycle regulation and p53 activation by protein phosphatase 2C alpha. *J Biol Chem* 278:14299-14305.
- Ossorio P. N., J. D. Schwartzman, and J. C. Boothroyd.** 1992. A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. *Mol Biochem Parasitol* 50:1-15.
- Owen M. R., and A. J. Trees.** 1999. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. *J Parasitol* 85:382-384.
- Park I. Y., B. H. Sohn, J. H. Choo, C. O. Joe, J. K. Seong, Y. I. Lee, and J. H. Chung.** 2005. Deregulation of DNA methyltransferases and loss of parental methylation at the insulin-like growth factor II (Igf2)/H19 loci in p53 knockout mice prior to tumor development. *J Cell Biochem* 94:585-596.
- Payne T. M., R. E. Molestina, and A. P. Sinai.** 2003. Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappaB function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. *J Cell Sci* 116:4345-4358.
- Pepper M., and C. A. Hunter.** 2007. Innate immune recognition and regulation of protective immunity to *Toxoplasma gondii* In *Toxoplasma. Molecular and Cellular Biology* Norkfork, Horizon Bioscience ed. 111-126.
- Perkins N. D.** 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:49-62.
- Peterson E. J., O. Bogler, and S. M. Taylor.** 2003. p53-mediated repression of DNA methyltransferase 1 expression by specific DNA binding. *Cancer Res* 63:6579-6582.
- Pfaff A. W., O. Villard, J. P. Klein, M. Mousli, and E. Candolfi.** 2005. Regulation of *Toxoplasma gondii* multiplication in BeWo trophoblast cells: cross-regulation of nitric oxide production and polyamine biosynthesis. *Int J Parasitol* 35:1569-1576.
- Pfaff A. W., A. Abou-Bacar, V. Letscher-Bru, O. Villard, A. Senegas, M. Mousli, and E. Candolfi.** 2007. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN-gamma. *Parasitology* 134:1895-1902.
- Pfefferkorn E. R.** 1984. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:908-912.
- Phelps E. D., K. R. Sweeney, and I. J. Blader.** 2008. *Toxoplasma gondii* rhoptry discharge correlates with activation of the early growth response 2 host cell transcription factor. *Infect Immun* 76:4703-4712.
- Plattner F., and D. Soldati-Favre.** 2008. Hijacking of host cellular functions by the Apicomplexa. *Annu Rev Microbiol* 62:471-487.
- Plattner F., F. Yarovinsky, S. Romero, D. Didry, M. F. Carlier, A. Sher, and D. Soldati-Favre.** 2008. *Toxoplasma* profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe* 3:77-87.
- Pollard A. M., K. N. Onatolu, L. Hiller, K. Haldar, and L. J. Knoll.** 2008. Highly polymorphic family of glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigens with evidence of developmental regulation in *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 76:103-110.
- Poupel O., H. Boleti, S. Axisa, E. Couture-Tosi, and I. Tardieux.** 2000. Toxofilin, a novel actin-binding protein from *Toxoplasma gondii*, sequesters actin monomers and caps actin filaments. *Mol Biol Cell* 11:355-368.
- Radke J. R., M. S. Behnke, A. J. Mackey, J. B. Radke, D. S. Roos, and M. W. White.** 2005. The transcriptome of *Toxoplasma gondii*. *BMC Biol* 3:26.
- Radke J. R., R. G. Donald, A. Eibs, M. E. Jerome, M. S. Behnke, P. Liberator, and M. W. White.** 2006. Changes in the expression of human cell division autoantigen-1 influence *Toxoplasma gondii* growth and development. *PLoS Pathog* 2:e105.

- Rapisarda A., B. Uranchimeg, D. A. Scudiero, M. Selby, E. A. Sausville, R. H. Shoemaker, and G. Melillo.** 2002. Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway. *Cancer Res* 62:4316-4324.
- Riess T., S. G. Andersson, A. Lupas, M. Schaller, A. Schafer, P. Kyme, J. Martin, J. H. Walzlein, U. Eehalt, H. Lindroos, M. Schirle, A. Nordheim, I. B. Autenrieth, and V. A. Kempf.** 2004. *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med* 200:1267-1278.
- Robben P. M., D. G. Mordue, S. M. Truscott, K. Takeda, S. Akira, and L. D. Sibley.** 2004. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J Immunol* 172:3686-3694.
- Rodriguez C., D. Afchain, A. Capron, C. Dissous, and F. Santoro.** 1985. Major surface protein of *Toxoplasma gondii* (p30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes. *Eur J Immunol* 15 : 747-749.
- Roiko M. S., and V. B. Carruthers.** 2009. New roles for perforins and proteases in apicomplexan egress. *Cell Microbiol* 11:1444-1452.
- Rome M. E., J. R. Beck, J. M. Turetzky, P. Webster, and P. J. Bradley.** 2008. Intervacuolar transport and unique topology of GRA14, a novel dense granule protein in *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 76:4865-4875.
- Rottach A., C. Frauer, G. Pichler, I. M. Bonapace, F. Spada, and H. Leonhardt.** 2009. The multi-domain protein Np95 connects DNA methylation and histone modification. *Nucleic Acids Res* 38:1796-1804.
- Saeij J. P., J. P. Boyle, and J. C. Boothroyd.** 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol* 21:476-481.
- Saeij J. P., J. P. Boyle, S. Coller, S. Taylor, L. D. Sibley, E. T. Brooke-Powell, J. W. Ajioka, and J. C. Boothroyd.** 2006. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* 314:1780-1783.
- Saeij J. P., S. Coller, J. P. Boyle, M. E. Jerome, M. W. White, and J. C. Boothroyd.** 2007. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* 445:324-327.
- Salceda S., and J. Caro.** 1997. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272:22642-22647.
- Sautel C. F., D. Cannella, O. Bastien, S. Kieffer, D. Aldebert, J. Garin, I. Tardieux, H. Belrhali, and M. A. Hakimi.** 2007. SET8-mediated methylations of histone H4 lysine 20 mark silent heterochromatic domains in apicomplexan genomes. *Mol Cell Biol* 27:5711-5724.
- Sautel C. F., P. Ortet, N. Saksouk, S. Kieffer, J. Garin, O. Bastien, and M. A. Hakimi.** 2009. The histone methylase KMTox interacts with the redox-sensor peroxiredoxin-1 and targets genes involved in *Toxoplasma gondii* antioxidant defences. *Mol Microbiol* 71:212-226.
- Scaffidi C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Kramer, and M. E. Peter.** 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17:1675-1687.
- Scaffidi C., I. Schmitz, J. Zha, S. J. Korsmeyer, P. H. Kramer, and M. E. Peter.** 1999. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* 274:22532-22538.
- Scanlon M., A. P. Shaw, C. J. Zhou, G. S. Visvesvara, and G. J. Leitch.** 2000. Infection by microsporidia disrupts the host cell cycle. *J Eukaryot Microbiol* 47:525-531.

- Schwab J. C., C. J. Beckers, and K. A. Joiner.** 1994. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:509-513.
- Schwartzman J. D., and E. R. Pfefferkorn.** 1982. *Toxoplasma gondii*: purine synthesis and salvage in mutant host cells and parasites. *Exp Parasitol* 53:77-86.
- Seabra S. H., R. A. DaMatta, F. G. de Mello, and W. de Souza.** 2004. Endogenous polyamine levels in macrophages is sufficient to support growth of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 90:455-460.
- Sen G. L., J. A. Reuter, D. E. Webster, L. Zhu, and P. A. Khavari.** 2010. DNMT1 maintains progenitor function in self-renewing somatic tissue. *Nature* 463:563-567.
- Shapira S., O. S. Harb, J. Margarit, M. Matrajt, J. Han, A. Hoffmann, B. Freedman, M. J. May, D. S. Roos, and C. A. Hunter.** 2005. Initiation and termination of NF-kappaB signaling by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 118:3501-3508.
- Sher A., C. Collazzo, C. Scanga, D. Jankovic, G. Yap, and J. Aliberti.** 2003. Induction and regulation of IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunol Res* 27:521-528.
- Shi L., W. K. Nishioka, J. Th'ng, E. M. Bradbury, D. W. Litchfield, and A. H. Greenberg.** 1994. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* 263:1143-1145.
- Sibley L. D., and J. C. Boothroyd.** 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359:82-85.
- Sinai A. P., P. Webster, and K. A. Joiner.** 1997. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci* 110 (Pt 17):2117-2128.
- Sinai A. P., and K. A. Joiner.** 2001. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol* 154:95-108.
- Sinai A. P., T. M. Payne, J. C. Carmen, L. Hardi, S. J. Watson, and R. E. Molestina.** 2004. Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 34:381-391.
- Spada F., A. Haemmer, D. Kuch, U. Rothbauer, L. Schermelleh, E. Kremmer, T. Carell, G. Langst, and H. Leonhardt.** 2007. DNMT1 but not its interaction with the replication machinery is required for maintenance of DNA methylation in human cells. *J Cell Biol* 176:565-571.
- Spear W., D. Chan, I. Coppens, R. S. Johnson, A. Giaccia, and I. J. Blader.** 2006. The host cell transcription factor hypoxia-inducible factor 1 is required for *Toxoplasma gondii* growth and survival at physiological oxygen levels. *Cell Microbiol* 8:339-352.
- Squatrito M., C. Gorrini, and B. Amati.** 2006. Tip60 in DNA damage response and growth control: many tricks in one HAT. *Trends Cell Biol* 16:433-442.
- Straub K. W., S. J. Cheng, C. S. Sohn, and P. J. Bradley.** 2009. Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. *Cell Microbiol* 11:590-603.
- Sullivan W. J., Jr., and M. A. Hakimi.** 2006. Histone mediated gene activation in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 148:109-116.
- Suzuki Y., A. Sher, G. Yap, D. Park, L. E. Neyer, O. Liesenfeld, M. Fort, H. Kang, and E. Gufwoli.** 2000. IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 164:5375-5382.

- Tato C. M., and C. A. Hunter.** 2002. Host-pathogen interactions: subversion and utilization of the NF-kappa B pathway during infection. *Infect Immun* 70:3311-3317.
- Taylor S., A. Barragan, C. Su, B. Fux, S. J. Fentress, K. Tang, W. L. Beatty, H. E. Hajj, M. Jerome, M. S. Behnke, M. White, J. C. Wootton, and L. D. Sibley.** 2006. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* 314:1776-1780.
- Templeton T. J., L. M. Iyer, V. Anantharaman, S. Enomoto, J. E. Abrahante, G. M. Subramanian, S. L. Hoffman, M. S. Abrahamsen, and L. Aravind.** 2004. Comparative analysis of apicomplexa and genomic diversity in eukaryotes. *Genome Res* 14:1686-1695.
- Tenter A. M., A. R. Heckerroth, and L. M. Weiss.** 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30:1217-1258.
- Thomsen-Zieger N., J. Schachtner, and F. Seeber.** 2003. Apicomplexan parasites contain a single lipoic acid synthase located in the plastid. *FEBS Lett* 547:80-86.
- Tolentino M. J., A. J. Brucker, J. Fosnot, G. S. Ying, I. H. Wu, G. Malik, S. Wan, and S. J. Reich.** 2004. Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor small interfering RNA inhibits growth and leakage in a nonhuman primate, laser-induced model of choroidal neovascularization. *Retina* 24:132-138.
- Tomavo S.** 2001. The differential expression of multiple isoenzyme forms during stage conversion of *Toxoplasma gondii*: an adaptive developmental strategy. *Int J Parasitol* 31:1023-1031.
- Torrey E. F., and R. H. Yolken.** 2003. *Toxoplasma gondii* and schizophrenia. *Emerg Infect Dis* 9:1375-1380.
- Trotzler M. A., C. Bronner, K. Bathami, E. Mathieu, A. Q. Abbady, M. Jeanblanc, C. D. Muller, C. Rochette-Egly, and M. Mousli.** 2004. Phosphorylation of ICBP90 by protein kinase A enhances topoisomerase IIalpha expression. *Biochem Biophys Res Commun* 319:590-595.
- Tschop K., and K. Engeland.** 2007. Cell cycle-dependent transcription of cyclin B2 is influenced by DNA methylation but is independent of methylation in the CDE and CHR elements. *FEBS J* 274:5235-5249.
- Tu Y., W. Wu, T. Wu, Z. Cao, R. Wilkins, B. H. Toh, M. E. Cooper, and Z. Chai.** 2007. Antiproliferative autoantigen CDA1 transcriptionally up-regulates p21(Waf1/Cip1) by activating p53 and MEK/ERK1/2 MAPK pathways. *J Biol Chem* 282:11722-11731.
- Unoki M., T. Nishidate, and Y. Nakamura.** 2004. ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain. *Oncogene* 23:7601-7610.
- Unoki M., J. Brunet, and M. Mousli.** 2009. Drug discovery targeting epigenetic codes: the great potential of UHRF1, which links DNA methylation and histone modifications, as a drug target in cancers and toxoplasmosis. *Biochem Pharmacol* 78:1279-1288.
- Vaena de Avalos S., I. J. Blader, M. Fisher, J. C. Boothroyd, and B. A. Burleigh.** 2002. Immediate/early response to *Trypanosoma cruzi* infection involves minimal modulation of host cell transcription. *J Biol Chem* 277:639-644.
- Varinou L., K. Ramsauer, M. Karaghiosoff, T. Kolbe, K. Pfeffer, M. Muller, and T. Decker.** 2003. Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN-gamma-dependent innate immunity. *Immunity* 19:793-802.
- Vazquez N., T. Greenwell-Wild, N. J. Marinos, W. D. Swaim, S. Nares, D. E. Ott, U. Schubert, P. Henklein, J. M. Orenstein, M. B. Sporn, and S. M. Wahl.** 2005. Human immunodeficiency virus type 1-induced macrophage gene expression includes the p21 gene, a target for viral regulation. *J Virol* 79:4479-4491.

- Vutova P., M. Wirth, D. Hippe, U. Gross, K. Schulze-Osthoff, I. Schmitz, and C. G. Luder.** 2007. *Toxoplasma gondii* inhibits Fas/CD95-triggered cell death by inducing aberrant processing and degradation of caspase 8. *Cell Microbiol* 9:1556-1570.
- Wakisaka N., S. Kondo, T. Yoshizaki, S. Murono, M. Furukawa, and J. S. Pagano.** 2004. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces synthesis of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol Cell Biol* 24:5223-5234.
- Walker M. E., E. E. Hjort, S. S. Smith, A. Tripathi, J. E. Hornick, E. H. Hinchcliffe, W. Archer, and K. M. Hager.** 2008. *Toxoplasma gondii* actively remodels the microtubule network in host cells. *Microbes Infect* 10:1440-1449.
- Webster J. P.** 2007. The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: playing cat and mouse. *Schizophr Bull* 33:752-756.
- Wilson E. H., U. Wille-Reece, F. Dzierszynski, and C. A. Hunter.** 2005. A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. *J Neuroimmunol* 165:63-74.
- Wittersheim P., Candolfi E., and Kien T.** 1994. Prevalence de la toxoplasmose humaine à Strasbourg. *J. Med. Strasbourg* 25:171-174.
- Wolffe A. P., and J. J. Hayes.** 1999. Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res* 27:711-720.
- Yamamoto M., D. M. Standley, S. Takashima, H. Saiga, M. Okuyama, H. Kayama, E. Kubo, H. Ito, M. Takaura, T. Matsuda, D. Soldati-Favre, and K. Takeda.** 2009. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *J Exp Med* 206:2747-2760.
- Yarovinsky F., D. Zhang, J. F. Andersen, G. L. Bannenberg, C. N. Serhan, M. S. Hayden, S. Hieny, F. S. Sutterwala, R. A. Flavell, S. Ghosh, and A. Sher.** 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308:1626-1629.
- Yeo E. J., Y. S. Chun, Y. S. Cho, J. Kim, J. C. Lee, M. S. Kim, and J. W. Park.** 2003. YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J Natl Cancer Inst* 95:516-525.
- Yolken R. H., F. B. Dickerson, and E. Fuller Torrey.** 2009. *Toxoplasma* and schizophrenia. *Parasite Immunol* 31:706-715.
- Youn J. H., H. W. Nam, D. J. Kim, Y. M. Park, W. K. Kim, W. S. Kim, and W. Y. Choi.** 1991. Cell cycle-dependent entry of *Toxoplasma gondii* into synchronized HL-60 cells. *Kisaengchunghak Chapchi* 29:121-128.
- Yuan H., M. Kamata, Y. M. Xie, and I. S. Chen.** 2004. Increased levels of Wee-1 kinase in G(2) are necessary for Vpr- and gamma irradiation-induced G(2) arrest. *J Virol* 78:8183-8190.
- Zeiner G. M., K. L. Norman, J. M. Thomson, S. M. Hammond, and J. C. Boothroyd.** 2010. *Toxoplasma gondii* infection specifically increases the levels of key host microRNAs. *PLoS One* 5:e8742.
- Zhang S. M., Y. Sun, R. Fan, Q. Z. Xu, X. D. Liu, X. Zhang, Y. Wang, and P. K. Zhou.** 2010. HIV-1 Tat regulates cyclin B1 by promoting both expression and degradation. *FASEB J* 24:495-503.
- Zhao R. Y., and R. T. Elder.** 2005. Viral infections and cell cycle G2/M regulation. *Cell Res* 15:143-149.
- Zheng D. L., L. Zhang, N. Cheng, X. Xu, Q. Deng, X. M. Teng, K. S. Wang, X. Zhang, J. Huang, and Z. G. Han.** 2009. Epigenetic modification induced by hepatitis B virus X protein via interaction with de novo DNA methyltransferase DNMT3A. *J Hepatol* 50:377-387.

Zimmermann S., P. J. Murray, K. Heeg, and A. H. Dalpke. 2006. Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling. *J Immunol* 176:1840-1847.

www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecellBM/index.htm

www.clontech.com

Résumés

Altérations épigénétiques et rôle du facteur de transcription UHRF1 dans les cellules-hôtes infectées par *Toxoplasma gondii*

La toxoplasmose, pathologie due à un parasite, *Toxoplasma gondii*, est l'une des infections les plus fréquentes en France : environ 50 % de la population adulte est infectée et on estime que 200 000 à 300 000 nouvelles infections surviennent chaque année dont 15 à 20 % sont symptomatiques. La gravité de l'infection est liée au risque de transmission fœtale du parasite en cas de contamination en cours de grossesse et au risque différé de réactivation sous l'effet d'une immunodépression. Il n'existe aucun traitement efficace visant les formes intracellulaires du parasite et aucun vaccin. *T. gondii* est un parasite intracellulaire obligatoire qui interfère avec les voies de signalisation moléculaires des cellules-hôtes et altère de nombreux phénomènes physiologiques comme la différenciation, l'apoptose et la prolifération. Le facteur de transcription UHRF1 (Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1) est un des principaux régulateurs du cycle cellulaire. Il présente des propriétés de « methyl-CpG-binding protein » qui lui confère un rôle crucial dans la réplication du code épigénétique lors de la prolifération cellulaire. Les mécanismes moléculaires par lesquels le parasite agit sur la cellule-hôte restent peu connus. Nous avons observé que l'infection par *T. gondii* conduit à une inhibition de la prolifération des cellules-hôtes due à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2. Ceci s'accompagne d'une diminution d'expression de la cycline B et d'une forte augmentation d'UHRF1 dans les cellules-hôtes. L'inhibition d'UHRF1 par des SiRNA induit une baisse significative de la croissance parasitaire. Nous avons observé une augmentation de liaison d'UHRF1 au promoteur de la cycline B au cours de l'infection par *T. gondii*. UHRF1 pourrait donc être responsable de la répression du gène de la cycline B conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire. *T. gondii* est un parasite unique, capable de moduler l'expression des gènes en interférant avec deux modifications épigénétiques importantes que sont la méthylation et la modification des histones. Or UHRF1 est un facteur de transcription qui relie ces deux modifications épigénétiques. Ceci ferait d'UHRF1 un outil puissant qui permettrait au parasite d'exploiter le génome de la cellule-hôte. L'activation d'UHRF1 ferait intervenir le facteur de transcription NF-κB et un facteur parasitaire issu des rhoptries.

Epigenetic alterations and role of the transcription factor UHRF1 in host cells infected with *Toxoplasma gondii*

Toxoplasmosis, caused by a parasite, *Toxoplasma gondii*, is one of the most common infections in France: about 50% of the adult population is infected and it is estimated that 200,000-300,000 new infections occur each year, 15-20% which are symptomatic. The severity of infection is due to the risk of fetal transmission of the parasite in cases of infection during pregnancy and the risk of reactivation in the case of immunosuppression. There is no efficient treatment for the intracellular forms of the parasite and no vaccine. *T. gondii* is an obligate intracellular parasite that interferes with the molecular signaling pathways of host cells and alters several physiological processes such as differentiation, apoptosis and proliferation. The transcription factor UHRF1 (ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1) is a key cell cycle regulator. It's also a "methyl-CpG-binding protein" that gives it a crucial role in the replication of the epigenetic code. The molecular mechanisms by which the parasite affects the host cell remain poorly understood. We observed that infection with *T. gondii* leads to an inhibition of proliferation of host cells due to cell cycle arrest in G2 phase. This results in a decrease of expression of cyclin B and a sharp increase in UHRF1 in host cells. Inhibition of UHRF1 by SiRNA in host cells induces a significant decrease in parasite growth. We observed an increase in

binding of UHRF1 to *cyclin B* promoter during infection with *T. gondii*. UHRF1 could be responsible for the repression of *cyclin B* gene, leading to cell cycle arrest. *T. gondii* is able to modulate gene expression by interfering with two important epigenetic modifications, methylation and histone modifications. UHRF1 is a transcription factor that connects these two epigenetic modifications. This would make UHRF1 a powerful tool that would allow the parasite to exploit the genome of the host cell. Activating UHRF1 involved the transcription factor NF- κ B and a factor based on the parasite rhoptries.