



HAL
open science

Etude de l'influence de la méthylation des histones sur la structure chromatinienne et l'expression génique chez *Toxoplasma gondii*.

Céline Sautel

► **To cite this version:**

Céline Sautel. Etude de l'influence de la méthylation des histones sur la structure chromatinienne et l'expression génique chez *Toxoplasma gondii*. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT: . tel-00340435

HAL Id: tel-00340435

<https://theses.hal.science/tel-00340435>

Submitted on 20 Nov 2008

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

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

CHAPITRE I : INTRODUCTION	2
PARTIE 1 : TOXOPLASMA GONDII.....	2
1. <i>La toxoplasmose</i>	2
2. <i>Toxoplasma gondii</i>	5
2.1. L'ultrastructure de <i>Toxoplasma gondii</i>	5
2.2. Le cycle biologique de <i>Toxoplasma gondii</i>	6
2.2.1. Le cycle sexué	6
2.2.2. Le cycle asexué.....	7
2.3. Le génome du Toxoplasme.....	7
2.4. Le processus d'interconversion est régulé transcriptionnellement.....	8
PARTIE 2 : CHROMATINE ET EPIGENETIQUE	11
3. <i>La méthylation de l'ADN</i>	12
4. <i>Le remodelage de la structure chromatinienne</i>	12
4.1. Le remodelage physique de la chromatine.....	12
4.2. Le remodelage chimique de la chromatine	13
4.2.1. L'acétylation des histones	14
4.2.2. La méthylation des histones.....	15
4.2.2.1. La méthylation.....	16
4.2.2.2. La déméthylation	17
4.3. Illustration de l'impact de la chromatine sur le processus de transcription	18
AVANT PROPOS	21
CHAPITRE II: ANALYSE DES RESULTATS	22
PARTIE 1 :	22
LA METHYLATION DE LA LYSINE 20 DE L'HISTONE H4 PAR TgSET8, MARQUE L'HETEROCHROMATINE CHEZ LES APICOMPLEXES.	22
1. <i>Avant propos</i>	22
2. <i>TgSET8, une enzyme particulière</i>	24
3. <i>TgSET8, entre cycle cellulaire et hétérochromatine</i>	26
3.1. H4K20-me marque l'hétérochromatine chez les Apicomplexes.....	26
3.2. TgSET8 assure la transmission de H4K20-me1 au cours du cycle cellulaire.....	28
3.3. Mode de régulation de l'activité de TgSET8 au cours du cycle cellulaire	30
4. <i>Rôle de TgSET8 dans la régulation transcriptionnelle</i>	32
5. <i>En guise de conclusion</i>	33
PARTIE 2 :	35
L'HISTONE METHYLTRANSFERASE KMT0X INTERAGIT AVEC UNE PEROXIREDOXINE 1, UN SENSEUR REDOX, ET SE LOCALISE AU NIVEAU DE GENES IMPLIQUES DANS LES REPONSES ANTIOXYDANTES CHEZ <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	35
1. <i>KMT0x interagit avec une peroxyredoxine</i>	35
2. <i>Propriétés enzymatiques de KMT0x</i>	37

3.	<i>Identification des gènes cibles de KMTox</i>	39
4.	<i>Discussion</i>	40
4.1.	KMTox/TgPrx1, complexe effecteur de la voie de signalisation des ROS	40
4.2.	Interaction KMTox/Prx1 et physiopathologie	43
5.	<i>Conclusion et Perspectives à court terme</i>	46
EN GUISE DE CONCLUSION		49
CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES		50
PARTIE 1 : MATERIEL		50
1.	<i>Amorces de clonage</i>	50
2.	<i>Vecteurs de clonage</i>	51
3.	<i>Enzymes utilisées</i>	51
4.	<i>Préparation d'ADN plasmidique et d'ARN totaux de tachyzoïtes</i>	51
5.	<i>Souches bactériennes</i>	51
6.	<i>Culture in vitro des parasites</i>	52
7.	<i>Anticorps</i>	52
PARTIE 2 : METHODES		55
1.	<i>Méthodes de biologie moléculaire</i>	55
2.	<i>Méthodes de biologie cellulaire</i>	55
2.1.	Obtention de lignées parasitaires recombinantes stables	55
2.2.	Immunofluorescence	56
2.3.	Traitement des parasites au H ₂ O ₂	56
2.4.	FACS	56
3.	<i>Méthodes de biochimie</i>	57
3.1.	Analyse d'extraits protéiques	57
3.2.	Purification d'anticorps sur colonne d'affinité	58
3.3.	Immunoprécipitation de protéines par des anticorps immunopurifiés	58
3.4.	Surexpression de protéines recombinantes chez <i>E.coli</i>	59
3.5.	Essais enzymatiques d'histone méthyltransferase	60
3.6.	Purification de cores histones de <i>Toxoplasma gondii</i>	60
3.7.	Purification de protéines taguées HA-Flag exprimées dans <i>T.gondii</i>	61
3.8.	Modélisation 3D de la structure de TgSET8	61
3.9.	Immunoprécipitation de la chromatine (Figure 18)	61
3.9.1.	Préparation de la chromatine	61
3.9.2.	Immunoprécipitation	62
3.9.3.	Identification des gènes cibles d'une enzyme de modification de l'ADN	63
3.10.	PCR quantitative en temps réel	64
ARTICLES PUBLIES		66
BIBLIOGRAPHIE		127
ABREVIATIONS		141

Chapitre I : Introduction

Partie 1 : *Toxoplasma gondii*

1. La toxoplasmose

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire obligatoire, qui appartient au règne des *Protista* et au phylum des *Apicomplexa* (Figure 1a). Il regroupe de nombreux agents pathogènes d'incidence majeure sur le plan médical et vétérinaire tels que *Plasmodium falciparum* responsable du paludisme ou *Eimeria* responsable des coccidioses aviaires.

La toxoplasmose est une infection qui se transmet naturellement des animaux vertébrés à l'Homme. Cette anthroponose cosmopolite constitue un problème de santé humaine aussi bien que vétérinaire. Des études séroépidémiologiques chez l'Homme et les animaux ont montré la large distribution géographique et la forte prévalence de la toxoplasmose. La prévalence de cette maladie dans la population humaine varie d'un pays à l'autre, en fonction des groupes ethniques, des habitudes alimentaires et des conditions d'hygiène. En Amérique du Nord, la prévalence est inférieure à 30%, alors qu'en France environ 60% de la population est séropositive. L'infection résulte principalement de la consommation de viandes crues ou peu cuites contenant des kystes parasitaires (Tenter et al., 2000).

La phase aigüe de l'infection à *Toxoplasma gondii* est généralement bénigne, voire asymptomatique. Elle peut parfois se traduire par un syndrome pseudo-grippal accompagné ou non d'adénopathies (Montoya and Liesenfeld, 2004). Lors de la phase aigüe, la réponse immunitaire de l'hôte restreint la dissémination des parasites et conduit à leur enkystement. Ce dernier a lieu dans les organes où la pression du système immunitaire est la plus faible (cerveau, muscles). La formation de kystes est caractéristique de la phase chronique de l'infection qui persiste toute la vie de l'individu. Les kystes sont généralement bien tolérés par l'organisme. Néanmoins, des études récentes montrent que l'infection par *T. gondii* constituerait un facteur favorisant le déclenchement de troubles du comportement, en particulier dans le développement de la schizophrénie (Mortensen et al., 2007; Torrey et al.,

2007). Si l'infection est habituellement asymptomatique chez l'hôte immunocompétent, elle peut s'avérer gravissime chez les personnes immuno-déprimées ou pour les fœtus.

La toxoplasmose congénitale résulte d'une primo-infection toxoplasmique acquise par la mère au cours de la grossesse. Une femme enceinte non immunisée qui est confrontée au parasite, peut développer une infection aiguë qui sera contrôlée par son système immunitaire. Par contre, le fœtus peut être contaminé par voie trans-placentaire ; or son système immunitaire encore immature l'empêche de réagir contre le parasite. En cas d'infection précoce de la mère, la complication la plus fréquente est l'encéphalomyélite qui peut provoquer la mort *in utero* et l'avortement spontané. La toxoplasmose est également un problème vétérinaire important puisqu'elle est responsable de nombreux cas d'avortements spontanés dans les élevages d'ovins et de caprins (Buxton, 1998).

La toxoplasmose qui touche les sujets présentant une immunosuppression sévère (atteinte par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), chimiothérapie ou traitements immunosuppresseurs) peut être gravissime. Elle résulte soit d'une primo-infection, soit d'une réactivation des parasites contenus dans les kystes chez un sujet antérieurement infecté (Mele et al., 2002). La réactivation parasitaire correspond à une conversion de la forme quiescente (parasites enkystés) à la forme proliférative (Figure 4b). Cette réactivation est suivie d'une multiplication et d'une dissémination des parasites dans l'organisme du patient. La toxoplasmose cérébrale chez les patients infectés par le virus du SIDA représente la deuxième infection opportuniste après la pneumocystose pulmonaire (Jones et al., 1996). Suivant les enquêtes, on estime qu'environ 12 à 47% des personnes infectées par le virus du SIDA et séropositives pour *T.gondii* souffriront d'une réactivation du parasite en l'absence d'un traitement prophylactique efficace. Les greffes de cœur, entre un donneur séropositif et un receveur séronégatif présentent aussi un risque élevé de transmission de la toxoplasmose. En effet, la réactivation des parasites présents dans le greffon est facilitée par le traitement immunosuppresseur mis en place pour éviter les épisodes de rejet. Dans le cas des patients subissant une greffe de moelle osseuse, le risque de réactivation toxoplasmique endogène est élevé chez les sujets séropositifs. En effet, irradié avant la greffe, le patient porteur latent de *T.gondii*, perd la capacité de répondre contre le parasite. Cette capacité n'est pas restaurée par le greffon séronégatif qui ne contient pas les cellules immunocompétentes sensibilisées vis à vis du parasite.

Un vaccin basé sur l'infection par une forme atténuée de parasite est employé avec succès pour lutter contre la toxoplasmose congénitale chez le mouton (Buxton and Innes, 1995). Mais étant donné les risques de réactivation, la vaccination chez l'homme par des parasites vivants est délicate. La recherche se tourne donc vers l'identification de molécules induisant la réponse immunitaire au cours de l'infection, afin de les utiliser comme candidats vaccinaux.

Actuellement, c'est le traitement associant la pyriméthamine avec la sulfadiazine qui a montré les résultats les plus encourageants. Cette association bloque le métabolisme de l'acide folique et limite donc la production d'acides nucléiques nécessaires à la multiplication du parasite. Cependant, l'utilisation de ces drogues entraîne des effets secondaires importants, et doit donc être limitée, notamment chez la femme enceinte (Bosch-Driessen et al., 2002). De plus, leur action se limite à la forme parasitaire proliférative et n'a aucun effet sur les kystes qui persistent dans l'organisme. Chez les malades immunodéprimés, ces traitements ne sont prescrits qu'après la réactivation parasitaire, c'est à dire après l'apparition des premiers symptômes d'encéphalite toxoplasmique (désorientation, somnolence, céphalées...). Dès lors, la maladie a déjà provoqué des séquelles irrémédiables. Les progrès pour le contrôle de cette maladie passent donc par une meilleure compréhension des facteurs de pathogénicité, en particulier des facteurs de résistance à l'hôte et du processus de réactivation.

Chez l'hôte intermédiaire immunocompétent, l'infection par *T. gondii* est le plus souvent asymptomatique en raison de l'efficacité du système immunitaire et d'un enkystement tissulaire rapide. Précocement au cours de l'infection, le toxoplasme induit une forte réponse immune non spécifique caractérisée par la production d'IFN- γ (Sher et al., 1993). Cette cytokine activatrice permet l'acquisition des fonctions microbicides et microbiostatiques des macrophages (Gazzinelli et al., 1996). L'un des mécanismes « toxoplasmicides » des macrophages correspond à la réaction oxydative (Hughes, 1988). L'activation des macrophages par l'IFN- γ induit notamment l'expression d'une iNOS (« inducible nitric oxyde synthase ») qui va permettre la production de NO (monoxyde d'azote). Le NO libéré est directement « toxoplasmicide » (Langermans et al., 1992). Il a également un effet microbiostatique, par inhibition de la respiration mitochondriale qui induit la conversion de la forme répliquative en forme quiescente (Bohne et al., 1993). Cependant, les parasites semblent capable d'échapper à ces mécanismes puisqu'ils possèdent des enzymes capables d'inactiver

les radicaux oxygénés (superoxyde dismutase, peroxiredoxine et catalase) (Brydges and Carruthers, 2003; Ding et al., 2004). Outre ces enzymes antioxydantes, une étude récente a mis en évidence le gène TgPL1, nécessaire pour la résistance des parasites au NO produit par les macrophages activés (Mordue et al., 2007). D'autres mécanismes, indépendants des radicaux oxygénés, existent et peuvent également empêcher la prolifération des parasites. L'activation des macrophages par l'INF- γ induit également l'expression de l'indolamine 2-3 dioxygénase. Cette enzyme dégrade le tryptophane intracellulaire, privant ainsi le toxoplasme de cet acide aminé. *Toxoplasma gondii* est auxotrophe pour le tryptophane, ce mécanisme entraîne donc un arrêt de la réplication du parasite (Murray et al., 1989).

2. Toxoplasma gondii

2.1. L'ultrastructure de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire obligatoire. Sa durée de vie en milieu acellulaire est limitée. Sa capacité à envahir les cellules est donc capitale pour sa survie. *Toxoplasma gondii* est capable d'infecter toutes les cellules nucléées dont les macrophages. Il pénètre la cellule hôte selon un processus différent de l'endocytose ou de la phagocytose qui sont utilisées par les virus, les bactéries ou encore par *Trypanosoma* (Sibley and Andrews, 2000). L'invasion des cellules hôtes est un phénomène actif qui dépend des différents organites du complexe apical qui, situé au pôle antérieur du parasite, a donné son nom au phylum (Dubremetz et al., 1998). Il a été conservé au cours de l'évolution et comprend les rhoptries, les micronèmes, les anneaux polaires et préconoïdaux et le conoïde (Figure 1b). Ce dernier joue un rôle mécanique dans l'invasion et permet la pénétration de la cellule hôte par le parasite. Les rhoptries, les micronèmes et les granules denses sont des organites de sécrétion propres au phylum des *Apicomplexa*. Ils contiennent des éléments impliqués dans la mobilité, l'adhésion à la cellule hôte et l'établissement de la vacuole parasitophore (Black and Boothroyd, 2000) (Figure 2a). L'invasion consiste en la formation d'une vacuole parasitophore dérivée du plasmalemme de la cellule hôte, mais modifiée par le parasite de telle manière que cette membrane est ensuite exclue du trafic membranaire intracellulaire, isolant le parasite des autres compartiments vésiculaires. Ce processus d'invasion permet au parasite d'échapper à la fusion avec les vacuoles lysosomales.

Toxoplasma gondii possède aussi un plaste non photosynthétique, l'apicoplaste, qui aurait été acquis par l'endosymbiose secondaire d'une algue rouge (Figures 1b et 3). On le retrouve

chez tous les parasites du phylum (Archibald et Keeling 2002). Le rôle de ce plaste vestigial dans le métabolisme du parasite n'a pas encore été clairement établi en dehors de celui dans la synthèse des lipides (De Lay and Cronan, 2007).

2.2. Le cycle biologique de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii entretient un cycle hétéroxène facultatif entre les félins (hôte définitif) et les autres homéothermes (hôtes intermédiaires). Le toxoplasme est capable d'infecter tous les organismes homéothermes par l'un des trois stades évolutifs suivants : tachyzoïte, bradyzoïte ou sporozoïte. Le parasite a un cycle de vie complexe avec un cycle sexué qui a lieu chez le chat et un cycle asexué qui a lieu chez les hôtes intermédiaires (Figure 4a).

2.2.1. Le cycle sexué

Les oocystes sont le produit de la reproduction sexuée qui a lieu chez l'hôte définitif (Figure 4a). Ils sont libérés dans les fèces du chat. L'hôte définitif s'infecte par ingestion d'oocystes matures souillant l'eau et les végétaux, et le plus souvent en mangeant une proie contenant des kystes de *Toxoplasma*. Les sporozoïtes contenus dans les oocystes matures, ou les bradyzoïtes (forme quiescente) contenus dans les kystes, sont libérés sous l'influence du système gastrique. Ils se transforment rapidement en tachyzoïtes capables de se diviser et de disséminer dans l'organisme. Ceux-ci se différencient ensuite en mérozoïtes et le cycle sexué débute dans l'épithélium intestinal des chats. Les mérozoïtes se multiplient par schizogonie, processus de division au cours duquel les noyaux parasitaires se multiplient dans un même cytoplasme et aboutissent à la libération d'autant de parasites (mérozoïtes) qu'il y a de noyaux (Ferguson, 2002). Après leur libération, les mérozoïtes se différencient en gamontes (microgamètes mâles et macrogamètes femelles). La fécondation des macrogamètes par les microgamètes donne naissance à des oocystes immatures qui sont libérés dans la lumière intestinale. Les oocystes dispersés dans l'environnement par les fèces du chat vont subir une phase de maturation appelée la sporogonie. Cette phase correspond à une série de divisions du zygote diploïde (une méiose suivie de deux mitoses) et aboutit à la formation d'oocystes matures contenant 8 sporozoïtes haploïdes (Dubey et al., 1998). Forme de résistance tellurique, l'oocyste représente la forme de contamination la plus fréquente des hôtes intermédiaires herbivores. En effet, les oocystes restent infectieux après plusieurs mois dans le sol et l'eau.

2.2.2. Le cycle asexué

Les hôtes intermédiaires s'infectent en consommant des aliments souillés par des oocystes ou des tissus contenant des kystes de *Toxoplasma* (Figure 4a). Comme chez le chat, les sporozoïtes ou bradyzoïtes libérés lors de la rupture des oocystes ou des kystes, se convertissent en tachyzoïtes. Le tachyzoïte est la forme à prolifération rapide du parasite, responsable de la phase aiguë de l'infection. Le tachyzoïte a la forme d'un croissant asymétrique mesurant 6 à 7 μm de long sur 2 à 3 μm de large. La pénétration du tachyzoïte dans une cellule hôte s'accompagne de la formation d'une vacuole parasitophore par invagination de la membrane plasmique de la cellule-hôte (Figure 2a). La membrane de la vacuole parasitophore possède plusieurs fonctions dont l'acquisition de nutriments cellulaires et la protection contre la cellule-hôte (Carruthers and Boothroyd, 2007). Le parasite prolifère à l'intérieur de cette vacuole parasitophore par un mécanisme de division particulier appelé l'endodyogénie (Figures 2b et 5a) (Gordon et al., 2008; Nishi et al., 2008). Après 6 ou 7 cycles de division au sein de la vacuole, il y a lyse de la cellule hôte et libération de 64 à 128 parasites. Chaque cycle de division dure de 6 à 8 heures. Les parasites libres vont alors infecter une nouvelle cellule hôte et débiter un nouveau cycle lytique et ainsi de suite (Figure 2b). Sous la pression du système immunitaire, les tachyzoïtes se différencient en bradyzoïtes (Figure 4b). Ces derniers correspondent à la forme quiescente du parasite. Ils sont responsables de la phase chronique de l'infection puisqu'ils vont perdurer toute la vie de l'hôte, sous forme de kystes dans les tissus nerveux et musculaires. Les kystes représentent la forme de dissémination et de contamination principale des carnivores.

En termes d'infectiologie, on peut résumer la fonction de chacune des formes parasitaire en disant que les tachyzoïtes augmentent la parasitémie chez l'hôte, et que les bradyzoïtes et les sporozoïtes, protégés dans des structures kystiques, permettent la transmission entre hôtes.

2.3. Le génome du *Toxoplasme*

Le génome de *T. gondii* est haploïde dans les stades asexués. Il contient environ 65 mégabases (Mb) d'ADN répartis en 14 chromosomes dont la taille varie entre 2 et 8 Mb. Le parasite a également deux génomes extra-chromosomiques circulaires : celui de la mitochondrie et celui de l'apicoplaste (Fichera and Roos, 1997; Wilson and Williamson, 1997). Depuis 2003, le génome de *Toxoplasma gondii* est séquencé avec une couverture de

10x et disponible en accès libre sur <http://www.toxodb.org>. Le site héberge, en plus d'une annotation partielle des gènes, des études de transcriptomique et de protéomique.

Organisme	Taille génome (Mb)	Nombre de gènes	Fraction codante
<i>H. sapiens</i>	3,000	30,000	1.4%
<i>D. melanogaster</i>	180	13,600	13%
<i>A. thaliana</i>	125	25,500	29%
<i>C. elegans</i>	100	19,100	27%
<i>S. pombe</i>	14	4,900	60%
<i>S. cerevisiae</i>	13	6,200	68%
<i>T. gondii</i>	65	7,900	~ 50%*

Tableau 1 : Comparaison du nombre de gènes par génome.
* Estimation (Radke et al., 2005)

Le génome parasitaire serait composé de 7000 à 8000 gènes. L'étude du transcriptome de *T. gondii* par SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) a permis d'estimer la densité génique à environ 50% du génome (Tableau 1, (Radke et al., 2005). Si la densité génique est relativement élevée, les gènes spécifiques des différentes voies métaboliques ne sont néanmoins pas regroupés sur le génome mais au contraire dispersés sur les 14 chromosomes, à l'exception de quelques uns. On peut donc exclure une co-régulation de type polycistronique comme chez la levure (Velculescu et al., 1997).

2.4. Le processus d'interconversion est régulé transcriptionnellement

Le parasite *Toxoplasma gondii* est doué d'un mécanisme de différenciation réversible appelé interconversion entre les formes tachyzoïte et bradyzoïte (Figure 4b). En effet, lors d'une infection par l'ingestion de kystes contenant des bradyzoïtes, il y a une première différenciation en tachyzoïtes, responsables de la phase aiguë de l'infection. Deux jours après l'invasion des tachyzoïtes, le processus d'enkystement débute, accompagné d'une nouvelle phase de différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes. Enfin, lors d'une immunosuppression, les bradyzoïtes peuvent se réactiver et se « dédifférencier » en tachyzoïtes. Ce processus d'interconversion est au centre de la pathogénèse et de la persistance du parasite dans l'hôte (Figure 4b). Définir les facteurs qui influencent

l'interconversion pourrait contribuer significativement au développement de nouvelles thérapies qui préviendraient la réactivation du parasite chez les patients immunodéprimés.

Les mécanismes qui régulent l'interconversion sont encore mal connus. Il est clair que l'interconversion est associée à des changements morphologiques du parasite, d'expression d'antigènes de surface spécifiques, ou encore à la mise en route de nouvelles voies métaboliques (Lyons et al., 2002). La conversion des tachyzoïtes en bradyzoïtes est un phénomène progressif, au cours duquel les parasites vont passer par une série de stades intermédiaires jusqu'au kyste mature contenant les bradyzoïtes (Lekutis et al., 2001; Zhang et al., 2001; Cleary et al., 2002; Ferguson, 2004; Van et al., 2007). Les analyses de transcriptomique par la technique « SAGE » révèlent que 23% des étiquettes sont spécifiques à un stade parasitaire (Radke et al., 2005). Le passage d'une forme parasitaire à l'autre reposerait donc sur un équilibre strict entre activation et répression de grandes familles de gènes (Cleary et al., 2002; Singh et al., 2002; Radke et al., 2005). L'ensemble de ces analyses suggère que le processus de régulation transcriptionnelle est le mécanisme majeur dans la régulation spécifique de l'expression des gènes chez *Toxoplasma gondii*, voire chez les Apicomplexes. Les sous-unités cœur des ARN polymérase I, II et III sont relativement bien conservées chez ces parasites ((Meissner and Soldati, 2005; Militello et al., 2005); Hakimi MA, communication personnelle)). Ainsi 60% des facteurs généraux de transcription des eucaryotes ont été retrouvés dans le génome de *Plasmodium*, incluant les membres du complexe TFIID (Callebaut et al., 2005). Par contre les éléments classiques de la structure promotrice eucaryote tels que la boîte TATA, CAAT ou les motifs de liaison du facteur de transcription SP1 n'y sont pas conservés. Une étude récente a mis en évidence des séquences spécifiques cis-activatrices qui permettraient de réguler l'expression spécifique de gènes selon le stade parasitaire (Behnke et al., 2008). Reste que la machinerie de transcription des *Apicomplexa* est relativement basique et rudimentaire par rapport à celle des autres eucaryotes ; en partie à cause de l'absence du complexe Mediator, très impliqué dans le recrutement des activateurs transcriptionnels (Meissner and Soldati, 2005). De plus, les études bio-informatiques montrent une pénurie de Facteurs de Transcription Spécifiques (FTs) chez les Apicomplexes (Tableau 2 et Figure 6) (Templeton et al., 2004; Balaji et al., 2005; Iyer et al., 2008). L'analyse détaillée des génomes de *Plasmodium falciparum* et de *Cryptosporidium parvum* montre une absence des domaines de liaison à l'ADN conservés chez l'ensemble des autres eucaryotes comme les domaines HTH, bZip, homeo, bHLH ou Fkh. Seuls quelques

rare domaines de type Zinc Finger C2H2 et E2F ont pu être identifiés (Templeton et al., 2004). Plus récemment, les facteurs de transcription spécifiques des plantes de la famille des AP2 ont été retrouvés dans le phylum (Balaji et al., 2005; Oakley et al., 2007; Iyer et al., 2008). Leur nombre varie entre 30 et 40. Les analyses d'interactome par double-hybride montrent que certains facteurs de *P. falciparum* sont au centre d'un réseau d'interactions qui fait intervenir des protéines connues pour remodeler la chromatine comme l'acétylase GCN5 (LaCount et al., 2005; Gissot et al., 2008; Iyer et al., 2008). Par ailleurs, notre équipe a identifié TgCRC350 comme un facteur AP2 associé à l'histone déacétylase HDAC3 (Saksouk et al. 2005). Ces facteurs seraient donc associés chez les Apicomplexes à la fois avec des activateurs et des répresseurs transcriptionnels (LaCount et al., 2005; Gissot et al., 2008; Iyer et al., 2008) (Figure 6).

Organismes	# Gènes (FTs/total)	%
<i>S. cerevisiae</i>	224/6569	3,4 %
<i>H. sapiens</i>	1962/21787	9 %
<i>T. gondii</i>	42/7817	~0,5 %

Tableau 2 : Estimation du pourcentage de gènes codant des Facteurs de Transcriptions Spécifiques (d'après (Messina et al., 2004).

Ainsi, lorsqu'on compare le pourcentage de gènes codant des FTs dans les différents organismes, il apparaît que la proportion de FTs augmente avec la complexité biologique : 3,4% pour *Saccharomyces cerevisiae*, 4,2% pour *Caenorhabditiselegans*, 5,5% pour *Drosophila melanogaster* et 9% pour *Homo sapiens* (Tableau 2) (Messina et al., 2004). Les parasites Apicomplexa ne semblent pas suivre cette règle car, malgré un cycle de vie relativement complexe, le nombre et la diversité des FTs restent faibles. Les bases moléculaires de la régulation transcriptionnelle intervenant lors de la différenciation chez *T. gondii* reposent donc probablement sur un mécanisme peu dépendant des FTs. L'hypothèse de travail de l'équipe est que la pénurie en facteurs de transcription spécifiques chez le Toxoplasme est compensée par une régulation fine de la structure chromatinienne.

Partie 2 : Chromatine et Epigénétique

Le nucléosome est l'unité fondamentale de la chromatine (Figure 7a). Il contribue à la première étape de compaction de l'ADN double brin. Un nucléosome est un complexe ADN-protéines composé d'un octamère d'histones associé avec environ 147 paires de base d'ADN. Quatre histones H2A, H2B, H3 et H4 en forment le cœur et l'histone H1 participe à la compaction de l'ADN à un niveau supérieur (Figure 7c). Les extrémités N- et C-terminales des histones, nommées les « queues d'histones » sont déstructurées et protubérantes à l'extérieur du nucléosome (Figure 7b). Cependant, elles jouent un rôle important dans le degré de compaction de la chromatine (Luger et al., 1997). Les histones sont extrêmement bien conservées à travers tous les organismes eucaryotes, soulignant ainsi leur importance biologique. Chez *Toxoplasma*, l'organisation nucléosomale est analogue à celle des eucaryotes, à l'exception de l'histone H1, pour laquelle aucun homologue a été identifié dans le génome du parasite à ce jour (Sullivan, 2003; Meissner and Soldati, 2005; Dalmasso et al., 2006; Sautel et al., 2007).

La chromatine se divise en trois compartiments distincts d'un point de vue structural, fonctionnel et cytologique (Figure 7d). L'euchromatine riche en gènes, globalement décondensée est une chromatine transcriptionnellement active. L'hétérochromatine est au contraire une chromatine condensée, transcriptionnellement inactive, contenant peu de gènes et beaucoup de séquences répétées (Figure 8a). Le nucléole est un peu particulier car bien que ressemblant à l'hétérochromatine d'un point de vue visuel, il est extrêmement actif transcriptionnellement puisqu'il est le siège de la synthèse et de l'assemblage de tous les ARN ribosomiaux (Figure 7d) (Grewal and Elgin, 2007).

Dans les cellules eucaryotes, la chromatine présente donc une organisation compacte dans laquelle la plupart des séquences d'ADN sont inaccessibles. Ainsi, l'état chromatinien détermine et contrôle l'accessibilité de l'ADN à divers facteurs nucléaires comme les facteurs de transcription. La cellule eucaryote doit faire face à la répression physique imposée par la structure chromatinienne avant d'amorcer un quelconque processus au niveau de la molécule d'ADN (transcription, réparation de l'ADN, réplication...). Trois grands mécanismes permettent de moduler la structure chromatinienne : la méthylation de l'ADN, les remodelages physique et chimique de la chromatine.

3. La méthylation de l'ADN

La méthylation des cytosines de l'ADN est une marque épigénétique importante qui accompagne les processus de différenciation et de développement des organismes supérieurs. Le niveau de méthylation de l'ADN influence l'expression des gènes : un haut niveau de méthylation se traduit le plus souvent par une faible expression ou l'inactivation du locus. Elle intervient dans l'inactivation du chromosome X chez les mammifères, la mise en place de l'empreinte génomique parentale ou encore l'expression de gènes spécifiques de tissus et semble impliquée dans les processus de cancérogénèse (Baylin and Herman, 2000). Le profil de méthylation de l'ADN est stable et transmis à chaque division cellulaire (Martin and Zhang, 2007). Cette modification, est localisée dans des régions génomiques spécifiques et touche la cytosine au sein des îlots CpG. Les DNA (cytosine 5) methyltransferases (Dnmt) sont les enzymes qui catalysent la réaction de transfert de méthyles sur les cytosines (Hermann et al., 2004). L'ADN génomique de *T. gondii* contient de nombreuses répétitions G-C mais ne présente pas de méthylation de l'ADN (5mC) à un niveau détectable. De plus les gènes codant des méthylases de l'ADN caractéristiques sont absents du génome (Gissot et al., 2008). Ceci indique fortement que la méthylation de l'ADN n'est pas un mécanisme majeur de la régulation de la structure chromatinienne chez *Toxoplasma gondii*.

4. Le remodelage de la structure chromatinienne

Différentes actions au niveau des nucléosomes vont conduire à une modification de la structure de la chromatine. Le nucléosome est le second pilier du système complexe d'activation et d'inactivation des gènes. Le remodelage de la chromatine met en jeu des complexes protéiques qui vont agir sur la composition, l'état de modification et la position des nucléosomes.

4.1. Le remodelage physique de la chromatine

Le remodelage de la structure chromatinienne met en jeu des complexes protéiques dont l'activité est dépendante de l'ATP. Plusieurs complexes de remodelage de la chromatine ont été identifiés. Les eucaryotes possèdent au moins 5 familles de remodeleurs de la chromatine : SWI/SNF, ISWI, NURD/Mi-2/CHD, INO80 et SWR1 (Gangaraju and Bartholomew, 2007). Ils ont tous en commun une sous-unité catalytique ATPase. L'activité ATPase permet au complexe de modifier la structure nucléosomique, en partie grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP (Kingston and Narlikar, 1999). Leur activité consiste à altérer les liens

histone-ADN dans le but d'ouvrir ou de fermer un locus chromatinien. Cependant, chaque famille a son mode d'action propre et ses spécificités avec une préférence pour certains types de substrats chromatiniens (Fan et al., 2003; Racki and Narlikar, 2008). De plus, la présence de domaines structuraux adjacents au domaine ATPase et leurs interactions avec d'autres protéines déterminent en partie leur spécificité d'action. Les modèles de modification de l'accessibilité de l'ADN incluent le glissement des nucléosomes le long de l'ADN, la formation de boucles d'ADN qui se détachent de l'octamère d'histones, l'exclusion d'octamères d'histones entiers ou encore le remplacement d'histones par des variants d'histone (Figure 9) (Polo and Almouzni, 2006; Cairns, 2007). En effet, en plus des quatre histones classiques H2A, H2B, H3 et H4, il existe un certain nombre de variants d'histones. Ils sont apparentés à l'une des quatre histones de base mais possèdent des propriétés physico-chimiques spécifiques et donc un rôle spécifique dans la structure et la fonction de la chromatine (Sarma and Reinberg, 2005; Bernstein and Hake, 2006). Chez *Toxoplasma gondii*, plusieurs de ces variants comme H2AZ ou H3.3 ont été identifiés (Sullivan WJ Jr, Naguleswaran A, Angel SO, 2006).

4.2. Le remodelage chimique de la chromatine

La surface des nucléosomes présente une multiplicité de modifications post-traductionnelles (PTMs) (Figure 10a). Le transfert de ces modifications sur les histones module le niveau de compaction de la chromatine. Ainsi, les modifications d'histones peuvent influencer de nombreux processus biologiques fondamentaux, dont certains peuvent être hérités épigénétiquement (Kouzarides, 2007). Neuf classes différentes de modifications chimiques ont été identifiées, parmi lesquelles on retrouve l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, la biotinylation, l'ubiquitination et la sumoylation. La majorité de ces modifications se situe au niveau de résidus localisés sur les queues d'histone, et quelques unes se trouvent dans le domaine globulaire des histones (Cosgrove and Wolberger, 2005; Hyland et al., 2005). Les modifications agissent i) en perturbant les interactions entre l'ADN et les histones (hypothèse de la neutralisation de charge), ou ii) en affectant le recrutement ordonné de complexes de remodelage de la chromatine (hypothèse du code histone) (Annunziato and Hansen, 2000; Strahl and Allis, 2000; Jenuwein and Allis, 2001; Ruthenburg et al., 2007). Ces deux modèles non exclusifs peuvent expliquer l'effet de ces modifications sur la structure chromatinienne. Étant donné la diversité des modifications possibles sur une seule histone et le nombre de résidus soumis aux différentes modifications, le nombre de combinaisons

potentielles sur un nucléosome est très élevé (Figure 10a) (Rando, 2007). De plus, l'état de modification d'un résidu peut être multiple (mono-, di-, triméthylation de H4K20 par exemple, Figure 11b). Il a été montré que le nombre de groupements méthyles présents sur une même lysine peut mener à différentes réponses, augmentant ainsi la complexité du « code histone » (Santos-Rosa et al., 2002). Enfin, les modifications d'histones peuvent agir en combinaison ou séquentiellement. En effet, une modification d'histone peut en influencer une autre de manière synergique ou antagoniste (Figure 10b) (Zhang and Reinberg, 2001; Latham and Dent, 2007). Ainsi, la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 favorise l'acétylation de la lysine 14 par GCN5 (Cheung et al., 2000; Lo et al., 2005) alors que la méthylation de la lysine 9 inhibe la transcription en empêchant la phosphorylation de la sérine 10 (Rea et al., 2000). L'ensemble des modifications d'histones constitue donc l'hypothèse du « code histone » qui associe à chaque combinaison de modifications, un état particulier de la chromatine et une réponse biologique spécifique (Jenuwein and Allis, 2001; Latham and Dent, 2007; Taverna et al., 2007).

La lecture du code met aussi en jeu un ensemble de protéines effectrices qui reconnaissent et se lient à des modifications particulières par le biais de domaines structuraux spécifiques (Strahl and Allis, 2000; Ruthenburg et al., 2007). Par exemple, les bromodomains et les chromodomains reconnaissent respectivement les lysines acétylées et méthylées (Figure 11a et 11c). Dans un deuxième temps, ces protéines lectrices transduisent les modifications en message biologique via par exemple, le recrutement d'autres enzymes de modification d'histones ou de remodelage physique de la chromatine. Ainsi, les différentes combinaisons de modifications post-traductionnelles des histones constituent des plate-formes spécifiques de recrutement de complexes en charge de l'établissement de la réponse biologique appropriée. Les modifications d'histones les plus étudiées à ce jour sont l'acétylation et la méthylation.

4.2.1. L'acétylation des histones

L'acétylation consiste en l'ajout de groupements acétyles sur des résidus lysines par des histones acétyltransférases (HAT). L'acétylation est associée à une activation de la transcription. C'est une marque réversible grâce à l'action des histones déacétylases (HDAC). L'effet de l'acétylation sur la transcription a longtemps été attribué au principe de

neutralisation de charge. En effet, l'ajout d'un groupement acétyle sur un résidu lysine neutralise la charge positive portée par l'acide aminé et ainsi, réduit l'interaction avec l'ADN. Le relâchement de la chromatine consécutif à l'acétylation des histones permet à d'autres facteurs d'accéder à l'ADN. Aujourd'hui, l'hypothèse du code histone attribue également à l'acétylation une fonction de plate-forme de recrutement d'activateurs de la transcription (Jenuwein and Allis, 2001). Ainsi, les coactivateurs transcriptionnels ont souvent une activité acétyltransférase propre ou sont associés au sein de grands complexes à des HAT. Les co-répresseurs sont eux souvent associés à des déacétylases (Bannister and Kouzarides, 1996). Cette modification participe à l'établissement des différents états chromatiens : permissif pour l'euchromatine hyperacétylée et répressif pour l'hétérochromatine hypoacétylée (Figure 8c) (Jeppesen and Turner, 1993). Ce code de l'acétylation s'applique également chez *Toxoplasma gondii* où la chromatine peut passer d'un état hypoacétylé à un état hyperacétylé assez rapidement, en fonction des conditions environnementales. Ainsi, ces changements du profil d'acétylation au niveau de certaines régions permettent une activation ou une répression très rapide des gènes qu'elles contiennent (Saksouk et al., 2005). De plus, la déacétylase HDAC3 antagonise l'acétylation médiée par GCN5a sur des gènes spécifiques aux stades tachyzoïte et bradyzoïte permettant de maintenir les parasites sous l'une des deux formes (Saksouk et al., 2005).

4.2.2. La méthylation des histones

De nombreuses études montrent clairement que la méthylation des histones, en particulier celle des résidus lysines, affecte la transcription (Kouzarides, 2002). De plus, elle est fortement associée chez les eucaryotes supérieurs à la régulation des processus de développement et de différenciation cellulaire (Zhang and Reinberg, 2001; Kouzarides, 2002; Rai et al., 2006). Par exemple, l'enzyme G9a qui méthyle H3K9 est essentielle aux stades précoces de l'embryogenèse chez la souris où elle est impliquée dans la répression transcriptionnelle de plusieurs gènes du développement (Tachibana et al., 2002). L'enzyme Ezh2 qui méthyle H3K27 est elle impliquée dans la différenciation du muscle squelettique (Caretta et al., 2004). Une étude plus récente réalisée chez le Zebrafish montre que l'enzyme Suv39h1 en méthylant H3K9 participe aux dernières étapes de développement de certains tissus (Rai et al., 2006).

4.2.2.1. La méthylation

La méthylation des histones, à la différence de l'acétylation, est associée à la fois à l'activation et à la répression transcriptionnelle (Tableau 3). L'effet sur la transcription dépend du résidu et de son état de méthylation (Zhang and Reinberg, 2001; Margueron et al., 2005). En effet, la méthylation peut s'effectuer sur des résidus lysines et arginines. La lysine peut être mono-, di-, ou triméthylée, alors que l'arginine peut être mono- ou diméthylée de manière symétrique ou asymétrique (Figure 11b) (Taverna et al., 2007). La méthylation des arginines est généralement liée à une activation transcriptionnelle tandis que la méthylation des lysines est liée à l'activation ou à la répression transcriptionnelle (Nakayama et al., 2000; Jenuwein and Allis, 2001; Litt et al., 2001; Zhang and Reinberg, 2001; Santos-Rosa et al., 2002; Taverna et al., 2002; Bernstein et al., 2005; Margueron et al., 2005). L'ajout de groupements méthyles ne modifie pas la charge de l'acide aminé sur lequel il est fixé (lysine ou arginine). Il est donc peu probable que la méthylation des histones agisse sur la transcription via une modification directe de la structure physique de la chromatine (hypothèse de la neutralisation de charge). Elle semble plutôt être une marque d'adressage des effecteurs capables de modifier la structure de la chromatine (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001; Huang et al., 2006).

Les histones méthyltransférases (HMT) sont les enzymes capables de réaliser le transfert d'un groupement méthyle sur différents résidus des queues d'histones. Ces enzymes sont classées en deux catégories selon leur spécificité de substrat : les KMT (Histone Lysine Methyltransferase) qui catalysent la méthylation de la chaîne latérale d'une lysine en position Σ -NH₂ ou les PRMT (Protein Arginine Methyltransferase) qui catalysent la méthylation d'une arginine (Zhang and Reinberg, 2001). Ces enzymes utilisent le S-adenosyl-L-méthionine comme donneur de groupements méthyles. Les histones méthyltransférases diffèrent d'une part selon leur spécificité de substrat, c'est-à-dire l'acide aminé qu'elles modifient et d'autre part selon le nombre de groupements méthyles qu'elles transfèrent (un, deux ou trois). Les KMT possèdent toutes un domaine catalytique conservé, le domaine SET (Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax) à l'exception de Dot1 (Jenuwein, 2001; Pijnappel et al., 2001; Khan and Hampsey, 2002; Lacoste et al., 2002). Le domaine SET est dans certaines familles d'enzymes, entouré par des domaines pre-SET et post-SET. La spécificité d'action des KMT, ainsi que le nombre de groupements méthyles ajoutés dépend de la nature de chaque enzyme et de la présence de certains cofacteurs. Les protéines contenant un

domaine SET peuvent être subdivisées en quatre sous-familles : SET1, SET2, RIZ et SUV39 (Kouzarides, 2002). Les membres de la sous-famille RIZ (Retinoblastoma Interacting Zinc finger) présentent la particularité de posséder de nombreux motifs en doigt de zinc. Les enzymes de la sous-famille SUV39 (SUppressor of Variegation 39) possèdent en amont du domaine catalytique un domaine pre-SET qui contribue à la spécificité de méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (Rea et al., 2000). Le tableau 3 résume les différents résidus lysines méthylés, leurs fonctions et les lysines méthyltransférases associées. Ce tableau est révélateur de la diversité de fonctions associées à cette modification. Ainsi, la méthylation des histones est un élément central dans la répression transcriptionnelle ainsi que dans la formation et le maintien de l'hétérochromatine (Volkel and Angrand, 2007). Les lysines méthyltransférases (KMT) de la famille SUV39 qui méthylent H3K9-me2 et H3K9-me3 jouent un rôle majeur dans ce processus (Figure 8b, 8c) (Allshire et al., 1995; Peters et al., 2001). Ces marques servent de plate-forme de recrutement des protéines HP1 qui répandent l'état chromatinien répressif aux régions adjacentes (Figure 8b) (Lehnertz et al., 2003). Une autre marque importante pour la mise en place et le maintien, voire la transmission aux cellules filles de l'hétérochromatine péricentrique est la méthylation de H4K20. Deux grandes familles, SUV420H et SET8, méthylent ce résidu à des degrés différents. L'interruption du gène *Su(var)4-20* chez la drosophile empêche la formation d'hétérochromatine (Schotta et al., 2004). La méthylation de H4K20 est apparemment spécifique aux métazoaires, alors que celle de H3K9 est universellement conservée, à l'exception notable de *Saccharomyces cerevisiae* qui ne possèdent aucune marque répressive (H4K20-me, H3K9-me et H3K27-me) (Figure 8c) (Volkel and Angrand, 2007). Chez cette levure la formation de l'hétérochromatine est essentiellement contrôlée par une histone déacétylase de la famille des Sirtuins qui maintient les histones de ces régions hypoacétylées (Kurdistani and Grunstein, 2003).

4.2.2.2. La déméthylation

Au début de ma thèse la méthylation des histones était dite très stable, voir même irréversible. Jusqu'à récemment, les seules enzymes connues pour modifier le groupement méthyle étaient les PeptidylArginine Déaminases (PAD4/PADI4), qui catalysent la conversion des arginines monométhylées des histones H3 et H4, en citrulline et ammonium-méthyl (Cuthbert et al., 2004; Wang et al., 2004). Ainsi cette réaction de déamination du résidu arginine conduit à une altération de la marque mais ne représente pas un mécanisme de transformation réversible en arginine nue. La première véritable histone deméthylase

caractérisée a été BHC110/LSD1 (lysine-specific demethylase-1) (Shi et al., 2004; Lee et al., 2005; Metzger et al., 2005). LSD1 ne peut utiliser comme substrat que les lysines mono- ou di-méthylées et catalyse la déméthylation de H3K4-me1 et de H3K4-me2. La déplétion de LSD1 dans des cellules de mammifère entraîne une augmentation de la transcription de certains gènes, ce qui corrèle avec le rôle activateur de H3K4-me1 dans la transcription (Shi et al., 2004). Associée avec le récepteur des androgènes, LSD1 déméthyle la lysine 9 de l'histone H3 (une marque de l'hétérochromatine) (Metzger et al., 2005). Ainsi, la protéine LSD1 agit à la fois comme un co-répresseur et un co-activateur transcriptionnel. En 2006, une nouvelle classe de déméthylases JHDM (JmjC domain containing histone demethylase) a été mise en évidence (Tsukada and Zhang, 2006). Les protéines à domaine JmjC, conservées depuis *S. pombe* jusqu'à l'Homme, déméthylent les lysines des histones par une réaction d'hydroxylation. Ce mécanisme réactionnel rend possible la déméthylation de lysines tri-méthylées que LSD1 n'est pas capable de catalyser. Les protéines JmjC catalysent préférentiellement la déméthylation de H3K36 *in vivo* et *in vitro* (Tsukada and Zhang, 2006) (Chen et al., 2006). Les histones déméthylases sont spécifiques d'un résidu et de son niveau de méthylation (-me1, -me2, -me3). Tout comme la méthylation des histones, la déméthylation est essentielle dans la régulation de nombreux processus biologiques. Une étude récente montre que la déméthylase JHDM1B est nécessaire à la répression des gènes codant les ARNr (Frescas et al., 2007). Cette enzyme semble impliquée dans la déméthylation de H3K4-me3 au niveau des ADNr. La synthèse des ribosomes est un processus hautement régulé car la synthèse protéique est un élément essentiel dans la croissance et la prolifération cellulaire. La dérégulation de cette enzyme conduit à un développement cellulaire anormal. Ainsi, dans les cellules tumorales, le niveau d'expression de la déméthylase JHDM1B est plus faible que dans les cellules normales (Frescas et al., 2007).

4.3. Illustration de l'impact de la chromatine sur le processus de transcription

Il y a quelques années, définir la transcription consistait essentiellement à décrire les facteurs composant la machinerie de transcription (polymérase, facteurs généraux de transcription), les facteurs de transcription spécifiques et les séquences d'ADN canoniques qu'ils reconnaissent. Aujourd'hui, il est saisissant de constater à quel point d'autres facteurs dits épigénétiques sont impliqués dans le processus de transcription. En effet, le remodelage de la chromatine intervient à toutes les étapes du processus ; de l'initiation, en passant par

l'élongation ou la protection contre des ré-initiations accidentelles, et ce, jusqu'à la terminaison de la transcription (Figure 12) (Li et al., 2007).

Dans un premier temps, lors du processus d'initiation de la transcription, la structure chromatinienne est remodelée dans une configuration permissive pour permettre au complexe de pré-initiation (PIC) de se mettre en place (Figure 12a). Le recrutement des histones acétylases va conduire à une augmentation du niveau d'acétylation des histones H3 et H4 présentes au niveau des régions proximales des promoteurs. L'acétylation des nucléosomes favorise le recrutement de facteurs de remodelage physique de la chromatine comme Swi/Snf. Ce dernier, *via* le déplacement des nucléosomes, facilite l'accessibilité à l'ADN (Cosma et al., 1999; Neely et al., 2002). Le variant d'histone Htz1 (ou H2AZ) est le troisième facteur important dans la mise en place du PIC (Guillemette et al., 2005; Li et al., 2005; Zhang et al., 2005). Des nucléosomes contenant Htz1 bordent la région promotrice, dépourvue de nucléosomes sur 200 paires de bases (Figure 12a). L'exclusion de cet histone variant facilite le déplacement des nucléosomes et favorise le recrutement du PIC au promoteur (Zhang et al., 2005; Zanton and Pugh, 2006; Li et al., 2007). Ainsi une série d'événements impliquant remodelages chimique et physique de la chromatine est nécessaire à l'initiation de la transcription (Figure 12a). Il en est de même pour le processus d'élongation. En effet, au cours de l'élongation l'ARN polymérase Pol II est associée à différents facteurs qui vont assurer le bon déroulement de la polymérisation de la nouvelle molécule d'ARN (Figure 12b). Les partenaires de la Pol II vont, d'une part, assurer l'ubiquitination des histones H2B. Cette modification aurait pour effet de favoriser la méthylation de H3K4 dont la fonction reste mal comprise (Sun and Allis, 2002; Li et al., 2007). D'autre part, des HATs se lient à la Pol II et permettent l'acétylation des nucléosomes qui précèdent la polymérase. Ces nucléosomes acétylés sont ensuite déplacés par des chaperones d'histones, comme la protéine FACT, afin de permettre le passage de la machinerie de transcription (Pavri et al., 2006). Les histones ré-incorporées après le passage de la Pol II sont hyperacétylées et sont immédiatement méthylées par l'histone lysine méthyltransférase Set2 (Figure 12b). Cette enzyme est responsable de la méthylation de la lysine 36 de l'histone H3. Cette modification est alors reconnue par une protéine à chromodomaine qui va à son tour recruter le complexe répresseur Rpd3S, à activité déacétylase. Une fois recruté, celui-ci va créer un environnement hypoacétylé défavorable à toute nouvelle liaison du PIC, avortant ainsi toutes initiations accidentelles qui auraient lieu à l'intérieur du gène en cours de transcription (Kim and

Buratowski, 2007; Li et al., 2007). Ainsi, l'élongation implique bien plus qu'une machinerie de polymérisation. Elle fait aussi intervenir des facteurs contrôlant la qualité du processus. En fin de transcription, l'environnement chromatinien du gène a retrouvé son état initial. La restauration de cet état stable permet de maintenir l'intégrité du génome. Un nouveau cycle de polymérisation est alors possible.

Avant propos

L'équipe travaille depuis maintenant quatre ans sur l'hypothèse d'une régulation du transcriptome parasite par des mécanismes du remodelage physique et chimique de la chromatine, et ceci en l'absence de méthylation de l'ADN (Gissot et al., 2008). Nous avons concentré nos efforts à analyser d'une part la cinétique et les inter-dépendances entre les différentes modifications des histones, et d'autre part les enzymes en charge de l'écriture du code chez *Toxoplasma gondii*. Il s'avère que le parasite possède de nombreuses enzymes à même de modifier les histones ou la structure de la chromatine (Figure 13). Les domaines spécifiques de liaison aux modifications chimiques des histones sont également conservés chez le parasite (Sullivan and Hakimi, 2006; Hakimi and Deitsch, 2007). Les analyses phylogénétiques ont permis d'identifier 19 histones lysines méthyltransférases chez *Toxoplasma gondii* (Figure 1A, Sautel et al. 2007) et 9 chez *Plasmodium falciparum*, (Cui et al., 2008). Un ou plusieurs membres de chaque grande famille (cf. 4.2.2.1) sont présents dans le phylum à l'exception de la famille Enhancer of Zeste (E(Z)), qui catalyse la méthylation de la lysine H3K27. En dehors des grandes familles, un grand nombre de KMTs dites orphelines ont été regroupées dans la famille SMYD (Figure 1A, Sautel et al. 2007). Certaines de ces protéines sont spécifiques au phylum des *Apicomplexa* ou encore propres au toxoplasme comme TgSET13/KMTox. Ma thèse a essentiellement porté sur la caractérisation de deux histones lysines méthyltransférases. Ce manuscrit se divise en deux parties qui synthétisent mes résultats publiés (Sautel et al., 2007 et Sautel et al., 2008). Dans chaque partie j'ai pris l'initiative de rappeler en quelques points les résultats importants présents dans les articles auxquels j'ai ajouté des résultats non publiés et une discussion. Les articles qui font l'objet de ce manuscrit ainsi que la revue dont je suis auteur (Bougdour et al. 2008) sont en annexe.

Chapitre II: Analyse des Résultats

Partie 1 :

La méthylation de la lysine 20 de l'histone H4 par TgSET8, marque l'hétérochromatine chez les Apicomplexes.

1. Avant propos

L'analyse bioinformatique a permis d'identifier 19 KMT putatives dans le génome de *Toxoplasma gondii*. Une étude phylogénétique a permis de les classer en plusieurs familles dont certaines sont conservées chez tous les eucaryotes. Nous avons été surpris d'identifier le gène 27.m00875 (TOXODB.org) codant une protéine homologue à l'enzyme humaine Pr-SET7/SET8, qui définit une famille décrite comme spécifique du règne animal (Figure 1A et Figure supplémentaire 1, Sautel et al. 2007) (Julien and Herr, 2004; Karachentsev et al., 2005). Le gène 27.m00875 a des homologues dans tous les génomes séquencés des parasites du phylum *Apicomplexa*; ce qui suggère l'apparition de ce gène chez l'ancêtre des Apicomplexes avant la diversification du phylum (Figure 1B, Sautel et al. 2007). Cette singularité évolutive n'est pas exclusive à TgSET8 car elle a été observée pour d'autres domaines protéiques présents uniquement dans les protéines de surface chez les animaux et les Apicomplexes (Templeton et al., 2004) et aussi pour l'enzyme CARM1 (Saksouk et al., 2005). Un homologue de SET8 étant absent chez les alvéolés, l'hypothèse d'une provenance de l'ancêtre « algue rouge » est improbable. La perte de gènes est un événement fréquent chez les eucaryotes. Il est donc possible que des protéines communes aux animaux et aux Apicomplexes, présentes dans l'ancêtre eucaryote, aient été perdues dans les autres espèces. Cependant aucun homologue du gène de SET8 n'a pu être détecté dans les génomes séquencés de champignons, de plantes ou d'autres eucaryotes unicellulaires comme les Trypanosomes ou encore Giardia. Les métazoaires sont très éloignés des Apicomplexes dans la phylogénie, l'hypothèse de la perte de SET8 dans toutes les autres espèces est donc peu probable. La présence de SET8 chez les Apicomplexes pourrait trouver son origine dans le transfert latéral de ce gène des métazoaires à leur parasite Apicomplexe. S'il est admis chez les bactéries, le transfert latéral entre cellules eucaryotes reste encore très controversé. Cependant une étude récente chez les rotifères étaye l'existence d'un tel mécanisme. En effet,

ils montrent que les rotifères possèdent de nombreux gènes d'origine bactérienne, fongique ou végétale (Gladyshev and Meselson, 2008). L'habitat de cet organisme lui impose des cycles de déshydratation/réhydratation. Ce mode de vie se traduit par une porosité importante de sa membrane et des processus de fragmentation/réparation de son ADN fréquents. L'hypothèse formulée dans cette étude repose sur le fait que le mode de vie particulier de cet invertébré pourrait faciliter le transfert latéral de gènes. De même dans notre modèle, le transfert horizontal aurait pu être facilité par le mode de vie intracellulaire des parasites. Si tel est le cas, le transfert de SET8 a certainement eu lieu très tôt bien avant la spéciation des métazoaires et des Apicomplexes.

L'enzyme humaine Pr-SET7/SET8 est responsable de la monométhylation de H4K20. Bien qu'absente chez *Saccharomyces cerevisiae*, cette modification se retrouve dans beaucoup d'organismes. Elle est catalysée par différentes familles d'enzymes et les différents états de méthylation (mono, di ou triméthyl) sont associés à des processus biologiques spécifiques comme la régulation de la transcription, la compaction de la chromatine, le cycle cellulaire et la formation de l'hétérochromatine (Santos-Rosa et al., 2002; Ruthenburg et al., 2007). Chez les mammifères, SET8 est associée à une chromatine fermée, elle participe à la régulation du cycle cellulaire en réprimant spécifiquement la transcription de certains gènes. La famille de Suv4-20, responsable de la di et tri-méthylation de H4K20, est impliquée dans la formation d'hétérochromatine chez les mammifères. Chez les plantes, la monométhylation de H4K20 est impliquée dans la formation d'hétérochromatine mais est catalysée par une SUVH2 de la famille des Suv3-9. Enfin, chez *Schizosaccharomyces pombe* la méthylation H4-K20 est catalysée par une enzyme de la famille SUV4-20h et n'a pas de rôle dans la répression de l'expression des gènes ou les fonctions d'hétérochromatine, mais est impliquée dans la réponse liée aux dommages de l'ADN (Sanders et al., 2004; Schotta et al., 2004). Chez *T. gondii*, nous observons la présence de mono-, di- et triméthylation au niveau des cores histones purifiés à partir de parasites extracellulaires (Figure 2A, Sautel et al. 2007). Par ailleurs, les marques H4K20-me1 et -me3 sont présentes dans le noyau des parasites intracellulaires (Figure 5A, 6B-D Sautel et al. 2007). L'anticorps H4K20-me3 marque aussi fortement la zone apicale des parasites (Figure 5C, Sautel et al. 2007). La zone apicale n'étant pas connue pour contenir de la chromatine, les anticorps reconnaissent probablement des protéines triméthylées. Aucun signal n'est observé avec l'anticorps H4K20-me2 dans les parasites.

Au cours de ma thèse, je me suis donc attachée à caractériser l'activité enzymatique et la fonction de cette enzyme décrite jusqu'alors comme spécifique des métazoaires.

2. TgSET8, une enzyme particulière

Afin de connaître les propriétés enzymatiques de TgSET8, nous avons réalisé des essais enzymatiques *in vitro* avec des protéines recombinantes purifiées chez *E.coli*. L'analyse par spectrométrie de masse et par western-blot des produits de réaction enzymatique montre que TgSET8 est capable de catalyser les réactions de mono-, di- et triméthylation (Figure 14 ; Figure 2D-E-F, Sautel et al. 2007). PfSET8 de *Plasmodium falciparum* présente les mêmes spécificités (Cui et al., 2008). La réalisation d'essais enzymatiques radioactifs sur différents substrats (nucléosome, octamère d'histone, histone H4) révèle que l'enzyme est plus efficace sur l'histone H4 libre. Ce résultat contredit les études biochimiques réalisées sur l'enzyme humaine SET8. En effet cette dernière modifie préférentiellement les nucléosomes plutôt que l'histone H4 ou les octamères d'histone (Xiao et al., 2005). Dans nos essais *in vitro* les cores histones purifiés de Toxoplasme ou de poulet présentent déjà un taux élevé de méthylation H4K20 ; cela peut expliquer la non permissivité de ce substrat à tout nouveau transfert de méthyle par TgSET8 *in vitro*. D'autre part, l'analyse par spectrométrie de masse de peptides H4 modifiés par TgSET8 montre que l'enzyme est capable de monométhyle mais pas de di- et triméthyle ce type de substrat (Figure 14). Ces résultats suggèrent que TgSET8 aurait besoin d'établir des interactions plus importantes avec son substrat physiologique pour pouvoir catalyser les réactions de di- et triméthylation. Ainsi, les interactions établies par l'enzyme avec le peptide ne seraient pas suffisantes pour le stabiliser dans la poche catalytique. L'importance des séquences adjacentes au résidu modifié et de la structure de l'histone dans la spécificité de l'activité enzymatique est largement documentée (Xiao et al., 2005). Une autre hypothèse est que l'interaction TgSET8/H4 est coopérative et conduit à une organisation particulière du site catalytique, nécessaire à l'activité triméthylase. Le pH influence également l'activité *in vitro*. La liaison d'un méthyle sur le substrat est efficace à tous les pH testés, tandis que le transfert de plusieurs groupements méthyles nécessite un pH basique (Figure 4E, Sautel et al. 2007). Cette sensibilité au pH réside dans le nombre d'étapes de déprotonation nécessaires. En effet, la monométhylation nécessite une seule étape de déprotonation de la lysine pour que l'attaque nucléophile sur le groupement méthyle du AdoMet soit possible. Dans le cas de la triméthylation, deux étapes de déprotonation supplémentaires sont nécessaires (Figure 15). Il existe deux modèles non exclusifs de

déprotonation. Il peut y avoir transfert d'un proton de la lysine soit à un résidu du site catalytique soit au solvant. La lysine possède un pKa basique, au-delà duquel elle est majoritairement déprotonée (NH₂). Ainsi, l'activité de triméthylation est optimale à un pH élevé, plus favorable aux étapes de déprotonation (Rice and Allis, 2001). La perte de l'activité triméthylase à pH<7,5 est donc cohérente. La salinité influence également l'activité enzymatique (Figure supplémentaire 2B, Sautel et al. 2007). A une concentration de NaCl de 200mM, TgSET8 est toujours capable de monométyler son substrat mais perd sa capacité à le trimétyler. Deux hypothèses peuvent expliquer cette perte d'activité. La première hypothèse est qu'à des concentrations élevées en sel les interactions enzymes/substrats sont déstabilisées. Alors ces interactions ne sont plus suffisamment fortes pour permettre la triméthylation du substrat. La seconde hypothèse est que la concentration en sel augmente le pKa de la lysine et réduit la capacité de la lysine à être déprotonée.

A la différence de son homologue humain, TgSET8 présente une activité multiple très inattendue sur le résidu K20. Alors que la cellule humaine mobilise deux enzymes, Suv4-20h et SET8, pour catalyser respectivement la di- et tri-méthylation et la monométhylation, le parasite avec une enzyme unique est capable de catalyser sur le résidu H4K20 les trois états méthylés (Figure 16). Les séquences de TgSET8 et HsSET8 sont très homologues (Figure 3A, Sautel et al. 2007). Nous avons donc utilisé la structure de HsSET8 résolue par cristallographie pour modéliser la structure du site catalytique de TgSET8. Le site catalytique de TgSET8 présente une taille, une géométrie et une hydrophobicité sensiblement différentes de celui de SET8 (Figure 3C, Sautel et al. 2007). Ainsi, la valine 1875 occupe la position d'une tyrosine chez SET8. La valine est un résidu plus petit et plus hydrophobe qu'une tyrosine. Ce résidu pourrait donc favoriser le réarrangement de la position du Σ -NH₂ de la lysine dans le site catalytique pour permettre l'étape de déprotonation et de méthylation suivante. La substitution de ce résidu par une tyrosine dans TgSET8 confère à la poche catalytique une structure quasi-similaire à celle de SET8 (Figure 4B, Sautel et al. 2007). De plus la protéine mutante TgSET8(V1875Y) a acquis les propriétés biochimiques de son homologue humaine puisqu'elle n'est plus capable de catalyser la triméthylation du résidu H4K20 (Figure 4B, Sautel et al. 2007). Ces résultats impliquent donc le résidu V1875 dans la multi-activité de TgSET8. La résolution de la structure de TgSET8 est en cours (Collaboration avec les Drs. Hassan Belrhali et Maria Jesus Mate Perez) et nous permettra de valider notre modèle. Les premiers résultats montrent qu'il est possible d'obtenir des cristaux

du site catalytique de TgSET8 co-cristallisé avec le peptide synthétique de H4 non modifié ou monométhylé et le S-adénosyl-homocystéine (Figure 16b). Les cristaux obtenus ont été irradiés à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) en Juillet 2008 et les clichés de diffraction obtenus sont en cours d'analyse. Nos collaborateurs vont tenter de résoudre la structure du corps catalytique de TgSET8 en utilisant comme modèle de départ le modèle de SET8 humain qui se trouve dans la Protein Data Bank (hSET8, PDB code : 1ZKK, (Couture et al., 2005).

3. TgSET8, entre cycle cellulaire et hétérochromatine

Nous nous sommes ensuite interrogés sur la fonction de TgSET8 et de H4K20-me *in vivo*. Pour tenter de répondre à cette question, nous avons essayé de développer une lignée Knock Out du gène TgSET8 mais sans succès. Il est fort possible que la délétion de ce gène soit létale. En effet, de nombreuses KMT sont décrites dans la littérature comme essentielles (O'Carroll et al., 2001; Peters et al., 2001). Chez *T. gondii* l'expression ectopique de TgSET8 (F1808Y) empêche la division des parasites transfectés ; cette mutation confère à l'enzyme *in vitro* et *in vivo* une diminution drastique de l'activité monométhylase au profit d'une activité triméthylase exacerbée (Figures 4C et S6, Sautel et al. 2007). La modélisation de TgSET8 intégrant la mutation F1808Y montre que cette substitution conduit à une poche catalytique à la fois profonde et relativement plus étroite à l'entrée (Figure 4C, Sautel et al. 2007). Le site actif plus étroit piège alors le peptide monométhylé, qui n'a d'autres choix que de subir le transfert d'un deuxième puis d'un troisième méthyle qui lui permettront enfin de se libérer. Ainsi, les parasites surexprimant TgSET8(F1808Y) et qui n'expriment plus la marque H4K20-me1 meurent dès le premier cycle de division, révélant un rôle essentiel à la monométhylation (Figure S6, Sautel et al. 2007). L'importance de la méthylation de H4K20 dans le bon déroulement de la mitose a été clairement observée chez les mammifères (Julien and Herr, 2004). La létalité des parasites surexprimant TgSET8(F1808Y), prouve également que si l'expression ectopique d'une copie sauvage de TgSET8 est possible, l'expression de la version mutée F1808Y ne l'est pas.

3.1. H4K20-me marque l'hétérochromatine chez les Apicomplexes

Pour caractériser la fonction de la monométhylation *in vivo*, nous avons réalisé des immunomarquages de parasites intracellulaires avec l'anticorps α H4K20-me1. Les noyaux des parasites étant très petits, il n'est pas aisé d'analyser en détail les marquages observés.

Cependant un grossissement des images d'immunofluorescence permet de voir que H4K20-me1 présente un marquage irrégulier avec des points de concentration de la fluorescence (Figure 5A-B, Sautel et al. 2007). Ce type de marquage rappelle celui de l'hétérochromatine péricentrique (Probst and Almouzni, 2008). Les anticorps α H4K20-me3 reconnaissent la périphérie du noyau (Figure 5C-D, Sautel et al. 2007), là où se localise généralement l'hétérochromatine périnucléaire chez les mammifères (Andrulis et al., 1998; Feuerbach et al., 2002). Chez *Plasmodium falciparum* cette marque colocalise avec les télomères qui émergent à la périphérie du noyau parasitaire (Freitas-Junior et al., 2005) (Figure 17 ; Figure 5E, Sautel et al. 2007). L'état de méthylation (mono versus triméthylation) est donc associé chez les Apicomplexes avec une régionalisation des marques sur les chromosomes qui rappellent les grands domaines d'hétérochromatine. L'analyse des résultats de ChIP-on-Chip de TgSET8 (Figure 18) a permis de mettre en évidence que l'enzyme se lie aux régions répétées télomériques (TTTAGGG)ⁿ de *Toxoplasma gondii* ; ce qui corrèle avec les marquages périnucléaires (Figure 7D-G, Sautel et al. 2007). De plus, l'enzyme se lie aux régions codant les ARN ribosomaux (Figure 7B-C-G, Sautel et al. 2007), connues pour être des régions hautement régulées au cours du cycle cellulaire. En effet, la synthèse des ARN ribosomaux consomme beaucoup d'énergie ; la cellule doit donc maintenir un équilibre strict entre la synthèse protéique et l'investissement énergétique que la production de ribosomes implique. Afin de répondre aux besoins en ribosomes, les cellules eucaryotes ont maintenu dans leur génome plusieurs centaines de gènes codant les ARNr. La transcription des ADNr peut être régulée par la modulation du taux de transcription par gène, ou par le contrôle de la proportion de gènes actifs. Il apparaît ainsi qu'une grande fraction des répétitions d'ADNr est située dans des régions d'hétérochromatine constitutive pour être maintenue sous silence (Grummt and Pikaard, 2003; Grummt and Ladurner, 2008). Enfin, la présence de TgSET8 sur des régions satellites et répétées du génome suggère également que la méthylation de H4K20 marque de l'hétérochromatine. Nous avons confirmé par QChIP (quantitative scanning ChIP) que TgSET8 colocalise avec les marques épigénétiques qu'elle catalyse (H4K20-me1 et -me3) mais aussi avec les méthylations sur la lysine 9 de l'histone H3 (Figure 7C-E-F-G et Figure supplémentaire 5C-D-E, Sautel et al. 2007). La méthylation de H3K9 est une marque bien connue des régions d'hétérochromatine constitutive (Tableau 3) (Schotta et al., 2002; Mellone et al., 2003; Peters et al., 2003; Naumann et al., 2005). Il faut noter ici que les taux d'enrichissement de cette marque sont relativement faibles (Figure Supplémentaire 5C-D-E,

Satel et al. 2007). Cela peut s'expliquer par le fait que cette marque soit liée à des domaines protéiques spécifiques qui créent alors un encombrement stérique, empêchant ainsi la liaison de l'anticorps à la marque. C'est le cas pour H3K9-3me chez les mammifères qui est une plateforme de liaison du domaine CHROMO de la protéine HP1 (Figure 8b, (Grewal and Jia, 2007)).

L'ensemble des résultats d'immunomarquages et de ChIP montrent que TgSET8 et les modifications qu'elle catalyse sont associées à des régions d'hétérochromatine connues pour être défavorables à l'expression génique. Plusieurs études font le lien entre la transmission de l'hétérochromatine au cours du cycle cellulaire et la méthylation de H4K20 (Rice et al., 2002; Sakaguchi and Steward, 2007; Houston et al., 2008). La question fut donc posée pour TgSET8.

3.2. TgSET8 assure la transmission de H4K20-me1 au cours du cycle cellulaire

L'anticorps α H4K20-me1 marque les noyaux des parasites intracellulaires avec des différences d'intensité entre les vacuoles (Figure 6B-D, Sautel et al. 2007). Un comarquage des parasites intracellulaires avec un marqueur de l'entrée en mitose (H3S10-P) montre que les vacuoles avec un marquage H4K20-me1 intense, présentent aussi un fort marquage pour H3S10-P et inversement (Figure 6D, Sautel et al. 2007). Sachant qu'au sein d'une même vacuole les parasites sont synchronisés, mais pas d'une vacuole à l'autre, la marque H4K20-me1 semble donc être régulée au cours du cycle cellulaire avec un pic d'intensité en mitose (Figure 19a) (Figure 6D-F, Sautel et al. 2007). Le cycle cellulaire de *Toxoplasma gondii* est particulier avec uniquement trois phases : des phases S et G1 majeures et une phase de mitose qui intervient immédiatement après la fin de la réplication de l'ADN (Figure 5b) (Gordon et al., 2008). Des mesures du contenu en ADN par cytométrie de flux ont montré que les phases G1 et S représentent respectivement environ 60 et 30 % d'un cycle de division (Radke et al., 2001). Ainsi, les parasites avec un contenu d'ADN de 2N correspondent à une sous-population relativement petite. Il n'y a aucune évidence de l'existence d'une phase G2 dans ces parasites (Figure 5b). De plus, le parasite se divise par endodyogénie (Gubbels et al. revue in press). C'est un processus de division où les deux cellules filles se forment à l'intérieur de la cellule mère puis se séparent (Figure 5a). Les parasites en phase M et plus particulièrement en phase de cytokinèse se distinguent facilement au microscope par la forme particulière, en fer à cheval, de leur noyau (Figure 6F, Sautel et al. 2007). L'observation de parasites en cours

de cytokinèse montre que la modification est présente dans le noyau des deux cellules filles. Cette observation peut suggérer une transmission de la marque au cours de la division parasitaire (Figure 6F, Sautel et al. 2007).

Des études montrent que SET8 est importante pour le déroulement de la phase S (Jorgensen et al., 2007; Tardat et al., 2007). Une autre étude indique que SET8 serait importante pour la transition G2/M (Houston et al., 2008). Malgré leurs divergences notables, ces travaux s'accordent sur le fait que SET8 et la méthylation de H4K20 jouent un rôle important dans la progression du cycle cellulaire et le contrôle de l'intégrité du génome. SET8 permettrait d'établir et de maintenir une structure chromatinienne garantissant une réplication et une réparation de l'ADN efficaces. Les mécanismes mis en jeu restent encore mal compris. Cependant il est clair que SET8 n'agit pas seule et que son activité est régulée au cours du cycle cellulaire (Julien and Herr, 2004; Huen et al., 2007; Jorgensen et al., 2007). Si la modification H4K20-me1 semble finement régulée au cours du cycle de division de *Toxoplasma gondii*, qu'en est-il de TgSET8 ? La quantité d'enzyme endogène étant très faible, nous avons utilisé une lignée surexprimant une seconde copie de l'enzyme étiquetée HA-Flag pour analyser par immunomarquage et par FACS la présence de l'enzyme au cours du cycle cellulaire. Elle est apparemment exprimée tout au long du cycle avec un pic d'expression en G1 (Figure 19a ; Figure 6C-E, Sautel et al. 2007). Son profil d'expression est inversement corrélé à celui de H4K20-me1 qui se distingue par son pic en mitose (Figure 19a ; Figure 6B Sautel et al. 2007). Ce profil est l'inverse de ce qui est observé chez les mammifères, où le pic de SET8 correspond au pic de H4K20-me1 (Rice et al., 2002). De plus, chez les mammifères, l'augmentation de H4K20-me1 en fin de phase S est accompagnée de la diminution de H4K20-me2, -me3 (Figure 19b) (Houston et al., 2008). Comment peut-on expliquer ce paradoxe de l'inadéquation entre l'enzyme parasitaire et sa marque? Il faut déjà signaler que si TgSET8 est faiblement exprimée en mitose, elle n'est cependant pas totalement absente (Figures supplémentaires S4 Sautel et al. 2007). De plus, il faut garder en mémoire que l'enzyme est capable de mono-, di- et trimétyler le résidu H4K20. On peut spéculer ici que le pic de H4K20-me1 en phase M chez le parasite puisse corrélérer avec le niveau le plus bas de H4K20-me2 et -me3. Par ailleurs, la présence majoritaire de TgSET8 en G1 pourrait être expliquée par le besoin important pour le parasite d'opérer les di- et triméthylations à ce stade du cycle (Figure 19a). Malheureusement nous n'avons pas pu tester cette hypothèse à cause du signal apical saturant le signal de détection avec l'anticorps

α H4K20-me3 et de la faiblesse du signal avec l'anticorps α H4K20-me1. Une autre hypothèse à l'abondance de TgSET8 en G1 est le besoin du parasite de méthyle d'autres substrats que l'histone H4 à ce stade du cycle. Par exemple SET8 est capable de monométyler p53 et participe ainsi à la régulation du processus de réparation de l'ADN (Shi et al., 2007).

3.3. Mode de régulation de l'activité de TgSET8 au cours du cycle cellulaire

TgSET8 pourrait donc être dédiée à des activités spécifiques au cours du cycle et cette activité spécifique pourrait être régulée par son abondance, ses partenaires et/ou d'autres facteurs environnementaux. Nos données nous permettent de formuler plusieurs hypothèses sur le mode de régulation de TgSET8 au cours du cycle cellulaire.

D'une part, nos essais enzymatiques *in vitro* dans différentes conditions de pH ($6 < \text{pH} < 9$) montrent que l'activité monométhyltransférase est effective à tous les pH testés tandis que l'activité triméthylase nécessite des conditions de pH élevées ($7,5 < \text{pH}$) (Figure 4E, Sautel et al. 2007). Ces expériences nous permettent donc de penser que le pH pourrait être un régulateur de l'activité de TgSET8 *in vivo*. De nombreuses études menées dans différents organismes modèles ont impliqué les variations du pH intracellulaire dans la régulation de différents processus biologiques (Karagiannis and Young, 2001). Bien que controversées, certaines études décrivent une différence de pH entre les compartiments nucléaires et cytoplasmiques (Seksek and Bolard, 1996). Des variations du pH intracellulaire au cours du cycle cellulaire, et plus particulièrement au cours de l'endodyogénie, pourraient être un mode de régulation de la spécificité d'action de TgSET8 au cours du cycle cellulaire.

D'autre part, l'expression de TgSET8 sous le contrôle d'un promoteur fort (GRA1) ne semble pas interférer avec les variations du niveau d'expression de la protéine étiquetée au cours du cycle cellulaire ; ce qui suggère un contrôle post-traductionnel de l'enzyme comme pour SET8 chez l'Homme (Yin et al., 2008). L'activité de SET8 sur la régulation de la réplication de l'ADN est contrôlée par sa dégradation et sa localisation. SET8 serait un inhibiteur de la réplication de l'ADN et sa dégradation serait nécessaire pour le déroulement de la phase S (Yin et al., 2008). SET8 est dégradée par la voie d'ubiquitination. Le pic d'expression de TgSET8 en G1 et son absence en phase S corréleraient avec ces données et suggèrent un mode de régulation de TgSET8 analogue. Des études supplémentaires sur la dégradation de TgSET8 au cours du cycle cellulaire permettront de conforter cette hypothèse.

Enfin, la spécificité d'action de TgSET8 pourrait être médiée par l'association à des partenaires différents au cours du cycle cellulaire. Ainsi, chez les mammifères, la délétion de HC1-F, un régulateur de l'activité méthylase de SET8, conduit à une mitose anormale (Julien and Herr, 2004). Afin d'identifier les protéines partenaires et éventuellement les autres substrats de TgSET8, nous avons déterminé biochimiquement son interactome. L'enzyme étiquetée (HAFlag) et exprimée ectopiquement dans la lignée transgénique RH::HAFlag-TgSET8 a été purifiée par chromatographie d'affinité α -Flag. Les fractions d'élution sont analysées par SDS-PAGE et par western blot (Figure 20). Les fractions d'intérêt ont été précipitées au TCA puis les protéines purifiées ont été séquencées par spectrométrie de masse MS-MS (Collaboration Jérôme GARIN, EdYP, INSERM-CEA). Plusieurs protéines avec un nombre significatif de peptides ont été identifiées, dont TgSET8.

1- Deux Hsp70 apparaissent avec une forte abondance : TgTwinScan7546 (59.m00003, ToxoDB.org) et TgTigrScan_1642 (583.m00009 ToxoDB.org). La surexpression ectopique de protéines dans le toxoplasme induit généralement la co-purification de chaperones de type Hsp70 et Hsp90, probablement en charge du repliement de la protéine chimérique en excès dans la cellule.

2- Une endonucléase AP (APE) ressort également de ce séquençage mais avec un faible nombre de peptides. Cette famille de protéines est impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN (Demple and Sung, 2005). Des études récentes montrent l'implication de SET8 dans le maintien de l'intégrité du génome (Jorgensen et al., 2007; Tardat et al., 2007; Houston et al., 2008). En effet, la délétion de SET8 conduit à une augmentation des cassures de l'ADN et à un déroulement anormal de la phase S. Les HMTs pourraient être essentielles lors de la synthèse de l'ADN pour rétablir le profil de méthylation de la chromatine néosynthétisée (Tardat et al., 2007). L'interaction de SET8 avec des protéines non histones joue également un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité du génome. Ainsi, SET8 interagit avec PCNA et est importante pour la progression des fourches de réplication (Jorgensen et al., 2007; Huen et al., 2008). De plus, SET8 est capable de monométyler p53 et pourrait ainsi participer à la régulation du processus de réparation de l'ADN (Shi et al., 2007). Considérant ces études récentes, l'interaction de TgSET8 avec une protéine de la famille des APE est relativement pertinente. En effet, TgSET8 pourrait avoir un rôle direct dans la réparation de l'ADN en adressant des facteurs de réparation de l'ADN comme APE au niveau des sites de réparation de l'ADN, ou en régulant l'activité de ces facteurs. Enfin, rappelons

que chez *Schizosaccharomyces pombe*, la méthylation de H4K20 est catalysée par Set9 et n'a pas de rôle dans la régulation de l'expression des gènes ou la formation d'hétérochromatine. Par contre, Set9 intervient dans les mécanismes de réparation de l'ADN en régulant l'adressage de Crb2 au niveau des cassures de l'ADN double brin. (Sanders et al. 2004). Il se peut que le rôle de H4K20-me dans la stabilité du génome soit une fonction apparue précocement dans l'évolution et que le rôle de H4K20-me dans l'hétérochromatine soit une fonction apparue plus tardivement avec la complexification des génomes. Chez *Toxoplasma*, comme chez les métazoaires les modifications H4K20-me pourraient donc participer aux deux fonctions. Il est alors intéressant de souligner que les métazoaires possèdent au moins deux histones lysines méthyltransférases distinctes phylogénétiquement pour remplir ces deux fonctions ; Suv-h20 et Pr-SET7/SET8 responsables respectivement de la triméthylation de H4K20 impliquée dans les fonctions d'hétérochromatine et de la mono et/ou diméthylation impliquée dans la réparation de l'ADN (Julien et Herr, 2004, Nishioka et al. 2002). *Toxoplasma* lui, posséderait une enzyme capable de catalyser les trois modifications et de participer aux deux fonctions cellulaires. Il serait donc intéressant de mener une étude plus poussée des partenaires potentiels de TgSET8 ; tout particulièrement la protéine APE afin de mieux définir le rôle éventuel de TgSET8 dans des processus de maintien de l'intégrité du génome.

4. Rôle de TgSET8 dans la régulation transcriptionnelle

A ce jour, la méthylation de H4K20 est principalement connue pour son rôle dans la répression transcriptionnel et dans la formation et la transmission de l'hétérochromatine (Fang et al., 2002; Schotta et al., 2004; Sims et al., 2006; Sautel et al., 2007). Cependant, des études récentes montrent un enrichissement en H4K20-me1 au niveau de promoteurs actifs ou de régions transcrites (Talas et al., 2005; Vakoc et al., 2006; Barski et al., 2007; Schones and Zhao, 2008). Ces résultats montrent que cette marque pourrait être impliquée dans l'activation transcriptionnelle chez les mammifères. Cette spécificité d'action pourrait être déterminée par le recrutement de différents effecteurs au niveau de H4K20-me1. Ces effecteurs seraient soit des activateurs, soit des répresseurs de la transcription (Rice and Allis, 2001). Une fonction de SET8 chez l'Homme serait de réguler l'expression de gènes impliqués dans le bon déroulement du cycle cellulaire (Jorgensen et al., 2007; Tardat et al., 2007). Nous n'observons pas par ChIP-on-chip de localisation de TgSET8 au niveau de gènes codant des protéines contrôlant le cycle cellulaire chez le *Toxoplasme*. Par contre, nous observons de manière

sporadique la présence de l'enzyme au niveau de régions chromosomiques contenant des gènes (Tableau 4). On y trouve un certain nombre de protéines hypothétiques, des enzymes métaboliques, un variant d'histone, des protéines de surfaces, des protéines de granules denses et des protéines de micronème. La localisation de TgSET8 au niveau de gènes cibles suggère que l'enzyme pourrait être un régulateur transcriptionnel, mais cela reste à démontrer.

5. En guise de conclusion

Nos travaux sur TgSET8 ont contribué à mieux définir l'hétérochromatine chez les Apicomplexes. Elle est a priori d'une complexité proche de celle des animaux avec des particularités propres au phylum. Nous apportons la preuve que la répression transcriptionnelle n'est pas uniquement à la charge de la déacétylase SIR2 chez les Apicomplexes, contrairement à ce que l'équipe du Dr. Artur Scherf avait précédemment affirmé (Duraisingh et al. 2005, Freitas-Junior et al. 2005). Le modèle de l'hétérochromatine chez la levure *S. cerevisiae* reposant uniquement sur un processus de déacétylation, n'est donc pas pertinent pour décrire la chromatine parasitaire. Il est clair que la méthylation de H3K9 (Chookajorn et al., 2007) et celle de H4K20 (Sautel et al. 2007) contribuent de manière significative à la mise en place et probablement à la transmission au cours du cycle cellulaire de cette chromatine non permissive chez le Toxoplasme mais aussi chez *P. falciparum*. Les infections persistantes et récurrentes par ce dernier, responsable du paludisme, résultent de la capacité du parasite à développer une importante variation antigénique et ainsi échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Cinquante gènes environ codent des protéines de surface qui permettent d'entretenir la variation antigénique (gènes var). Ces gènes ont, à plus de 80 %, une localisation subtélomérique. L'expression séquentielle de ces gènes var est étroitement régulée par un mécanisme d'extinction de tous les gènes de la famille sauf un. Le mécanisme mis en jeu implique la propagation de l'hétérochromatine télomérique et le repositionnement des régions contenant ces gènes au niveau de domaines nucléaires répressifs (Duraisingh et al., 2005; Freitas-Junior et al., 2005). Il serait donc intéressant de reprendre les résultats sur la régulation des gènes var et de regarder si H4K20-me et PfSET8 sont impliquées dans la variation antigénique chez *P. falciparum*.

Notre analyse par ChIP-on-chip nous a aussi permis de voir que les régions de liaison de TgSET8 sont « protégées » de l'étalement de l'euchromatine voisine. Nous avons comparé la cartographie de TgSET8 avec celle du taux d'acétylation de l'histone H4 après induction ou

non à la molécule A, un inhibiteur de la déacétylation. La Figure 21 est un exemple pertinent de la séparation topographique des domaines chromatiniens chez *T. gondii*. Le locus choisi réunit un pseudogène B1 (541.m01140) voisin direct d'une unité transcriptionnelle d'ARNr et d'une série de répétitions auxquelles TgSET8 est spécifiquement associée. Après induction avec la molécule A, on observe une hyperacétylation des nucléosomes dans l'environnement du pseudogène B1, qui est limitée dans sa propagation par la présence de TgSET8 (Figure 21). Le gène B1 est probablement réprimé au sein d'un domaine d'hétérochromatine facultative établie par déacétylation des histones et donc sensible à l'activité de la molécule A. Par contre, les régions d'ADNr et répétées où se localise TgSET8 sont insensibles à l'activité de la molécule A. Ces domaines d'hétérochromatine ne semblent donc pas établis par l'activité déacétylase. Ces données suggèrent que TgSET8 se localise au sein de domaines d'hétérochromatine constitutive, très stable. Cela pose donc la question de la contribution directe de TgSET8 dans la formation et le maintien de l'hétérochromatine constitutive ; ainsi que du mécanisme permettant de délimiter les régions d'euchromatine et d'hétérochromatine chez *Toxoplasma gondii*.

Si la séquence primaire des enzymes est généralement conservée chez *Toxoplasma gondii*, certaines comme TgSET8 se distinguent par des modifications dans leur corps catalytique qui leur confèrent des fonctions particulières. Cela permet sans doute au parasite de pouvoir entretenir un cycle de vie complexe malgré son petit génome codant (7900 protéines contre 6200 chez *Saccharomyces cerevisiae*). La double activité de mono- et de tri-méthylase de TgSET8 est un exemple frappant des particularités du parasite. Notre étude laisse cependant la porte ouverte à toute interprétation quant à l'origine évolutive de TgSET8. Et si l'hypothèse d'un transfert latéral est avancée, elle reste à être démontrée.

Partie 2 :

L'histone méthyltransférase KMTox interagit avec une peroxiredoxine 1, un senseur redox, et se localise au niveau de gènes impliqués dans les réponses antioxydantes chez *Toxoplasma gondii*.

Pendant ma thèse je me suis également intéressée à la caractérisation biochimique et fonctionnelle d'une nouvelle histone lysine méthyltransférase putative : TgSET13 qui a été renommée KMTox dans l'article Sautel et al. 2008. Cet article était en révision au journal *Molecular Microbiology* lors de la rédaction de ce manuscrit. Les nouvelles données obtenues suite à la révision, ont conduit à de nouvelles conclusions qui ne font donc pas l'objet de ce manuscrit. La version initialement jointe au manuscrit a été remplacée par la version acceptée de l'article Sautel et al. 2008.

KMTox présente en plus du domaine catalytique SET, un motif de liaison à l'ADN, HMG (High Mobility Group), ainsi qu'une séquence d'adressage nucléaire NLS (Nuclear Localization Signal). La présence de ces domaines révèle un rôle possible de KMTox dans la régulation de l'expression génique chez le parasite, ce qui a suscité notre intérêt. Nous avons donc initié la caractérisation de cette protéine en étudiant sa localisation sub-cellulaire, son interactome spécifique, ses propriétés enzymatiques et ses localisations chromosomiques.

1. KMTox interagit avec une peroxiredoxine

Les histones méthyltransférases sont souvent intégrées dans de grands complexes protéiques d'une taille globulaire parfois supérieure au million de Dalton (Zhang and Reinberg, 2001; Kouzarides, 2002). Certaines KMT comme Ezh2 sont inactives en absence de leurs partenaires (Cao and Zhang, 2004). La caractérisation des activités enzymatiques natives impose donc souvent la purification biochimique des complexes qui les contiennent. Nous avons donc entrepris la purification de l'enzyme et de ses partenaires potentiels à partir d'une lignée exprimant ectopiquement une version étiquetée HA-Flag de KMTox. Dans un fond génétique RH, l'expression ectopique de KMTox permet de mettre en évidence une localisation exclusivement nucléaire de la protéine au stade tachyzoïte (Figure 1A, Sautel et al. 2008). Cette localisation est très probablement médiée par le domaine NLS. L'étiquette Flag a permis d'immunopurifier la protéine chimérique par chromatographie d'affinité α -Flag. Les fractions éluées à l'aide du peptide compétiteur FLAG, testées positives par

Western Blot (α -HA), ont été réunies et analysées par chromatographie d'exclusion de taille (Superose 6, FPLC Akta,) (Figure 1B, Sautel et al. 2008). L'étude par coloration au nitrate d'argent et par western-blot des fractions issues de la filtration sur gel révèle que la protéine HA-Flag-KMTox (64-kDa) est présente dans les fractions 22 à 32, soit entre 1 MDa et 60 kDa avec une dégradation importante de la protéine chimérique dans les fractions 27 à 33 (Figure 1C, Sautel et al. 2008). Sa présence dans les fractions 22-24 indique qu'elle appartient à un complexe multi-protéique d'une taille globulaire d'environ 1 MDa. Les différentes protéines de ce complexe ont été identifiées par spectrométrie de masse de type MS-MS en collaboration avec le Dr Jérôme Garin (INSERM-CEA, EdyP) (Figure 1D, Sautel et al. 2008). L'analyse des peptides indique la présence de plusieurs protéines du choc thermique HSP (Heat Shock Protein). La sur-expression ectopique de protéines dans le toxoplasme induit généralement la co-purification de chaperones de type HSP70 et HSP90 en charge du repliement de la protéine chimérique en excès dans la cellule. Le résultat le plus inattendu est l'identification d'une 2-Cys peroxiredoxine typique (TgPrx1, gène 37.m0001, www.toxoDB.org) comme partenaire stoechiométrique de KMTox. TgPrx1 est décrite comme une enzyme participant au maintien de l'homéostasie redox intracellulaire chez *Toxoplasma gondii* (Ding et al., 2004; Akerman and Muller, 2005). La pertinence de l'interaction TgPrx1-KMTox a pu être vérifiée en montrant que TgPrx1 n'est pas immunopurifiée avec d'autres protéines TgSET telle que TgSET4, et que KMTox n'est pas associée à d'autres peroxiredoxines du parasite telle que TgPrx2 (Figure 2A, Sautel et al. 2008). Nous avons ensuite voulu valider l'interaction entre KMTox et TgPrx1 par immunoprécipitation inverse en exprimant une version étiquetée HAFlag de TgPrx1 dans des parasites. L'immunomarquage α -HA de cette lignée TgPrx1 révèle qu'une quantité importante de l'enzyme est nucléaire (Figure 2D et 2E, Sautel et al. 2008). Les fractions purifiées, par chromatographie d'affinité α -Flag et d'exclusion de taille (Superdex 200), enrichies en TgPrx1-HAFlag, ont été analysées par coloration au nitrate d'argent et western blot (Figure 2B, Sautel et al. 2008). KMTox co-élue parfaitement avec la protéine chimérique entre 670 et 440 kDa (Fractions 18-22). Nous observons, par ailleurs, que la quantité de TgPrx1-HAFlag est bien supérieure à celle de KMTox, indiquant un déséquilibre stoechiométrique probablement induit par la sur-expression de TgPrx1 et la présence d'une quantité limitante de KMTox endogène. Ces résultats confirment donc une interaction spécifique entre KMTox et TgPrx1. La présence de TgPrx1 (21,7 kDa) dans des fractions correspondant à une taille

globulaire supérieure à 500 kDa (Superose 200, Fractions 18-22) peut être expliquée par la capacité de certaines peroxiredoxines à former des structures multimériques homogènes (dimère et décamère) (Wood et al., 2003b). Nos analyses biochimiques convergent donc vers un modèle d'interaction d'un décamère de TgPrx1 avec l'enzyme KMTox. La présence au sein d'un même complexe de KMTox et de TgPrx1 et leur co-localisation au niveau du noyau suggère que les deux enzymes partagent une fonction biologique nucléaire (Figure 2D et 2E, Sautel et al. 2008).

L'implication de TgPrx1 dans les processus de défense contre le stress oxydant nous a conduit à étudier l'impact du stress oxydatif sur son interaction avec KMTox. Nos résultats montrent que le stress H₂O₂ imposé aux parasites favorise l'interaction TgPrx1-KMTox (Figure 2C, Sautel et al. 2008). En effet, nous détectons une quantité plus importante de protéine TgPrx1 co-éluée avec KMTox dans les extraits provenant de parasites soumis à une dose importante de H₂O₂ exogène. La contribution de KMTox dans la résistance au stress oxydant a été évaluée en mesurant la capacité des parasites à résister à un traitement H₂O₂. Nous avons donc comparé le nombre de vacuoles formées par la souche de parasites sauvages et la lignée sur-exprimant la protéine KMTox après que celles-ci aient été soumises ou non à un pré-traitement de 200µM de H₂O₂. Ce type d'expérience a été décrit précédemment pour des lignées parasitaires surexprimant Prx2 (Ding et al., 2004). Les parasites exprimant fortement KMTox sont plus résistants au traitement H₂O₂ que les sauvages (Figure 3A, Sautel et al. 2008). L'expression endogène de KMTox dans les tachyzoïtes est très faible (Figure 6A, Sautel et al. 2008), il semblerait donc qu'augmenter son expression via l'expression sous le contrôle du promoteur fort GRA1, augmente les capacités de défense des parasites contre les effets du peroxyde d'hydrogène.

2. Propriétés enzymatiques de KMTox

Afin de connaître les propriétés enzymatiques de KMTox, nous avons réalisé des essais enzymatiques *in vitro* avec des protéines recombinantes purifiées d'*E.coli* ou des extraits purifiés de KMTox-HAFlag, sur différents substrats. La protéine recombinante 6(his)-KMTox purifiée chez *E. coli* ne présente aucune activité méthylase détectable, tandis que la protéine purifiée de *T.gondii* HAFlag-KMTox est capable de catalyser les réactions de méthylation des histones H2A et H4 seules ou intégrées dans un octamère (Figure 4A-B, Sautel et al. 2008). Ces résultats suggèrent que KMTox nécessite une conformation particulière ou l'interaction

avec d'autres partenaires comme TgPrx1 pour être active. Ces données sont en accord avec d'autres KMTs intégrées dans de grands complexes protéiques (Zhang and Reinberg, 2001; Cao and Zhang, 2004; Kouzarides, 2007). L'activité KMTox sur l'histone H2A incluse dans le core histone semble plus faible que sur l'histone seule et est visible uniquement après une exposition prolongée du film (Figure 4A, Sautel et al. 2008). Ce qui peut s'expliquer par une diminution de l'accessibilité du résidu lorsque l'histone est organisée en octamère. Cependant il s'agit de la configuration adoptée par les histones *in vivo*. Ces données amènent à s'interroger sur la nature physiologique du substrat H2A pour KMTox (Xiao et al., 2005). Une autre hypothèse est que les cores purifiés de Toxoplasme utilisés dans les essais enzymatiques *in vitro* présentent déjà un taux élevé de méthylation sur H2A. Cela peut expliquer que H2A au sein des cores histones soit moins permissive au transfert de méthyles par KMTox. Par ailleurs, nous n'avons pas pu déterminer le(s) résidu(s) spécifique(s) reconnu(s) par KMTox sur les histones faute d'une activité robuste de l'enzyme *in vitro*.

Nous avons ensuite examiné la sensibilité au pH de KMTox. Il apparaît que l'enzyme a une activité optimale à pH 8.5 et présente un seuil limite à pH 7.5 (Figure 4D, Sautel et al. 2008). Ces résultats sont en accord avec la sensibilité au pH observée pour plusieurs enzymes KMT (Xiao et al., 2005). Le transfert du groupement méthyle sur la lysine nécessite la déprotonation du substrat. La sensibilité au pH reflète les étapes de déprotonations du substrat nécessaires pour le transfert de plusieurs groupements méthyles. La déprotonation se fait par transfert d'un H⁺ sur un résidu HO⁻ (Figure 15). A pH acide, la quantité de résidus HO⁻ libres est faible, les pH acides sont donc défavorables aux étapes de déprotonation. Les monométhyltransférases sont moins sensibles au pH car une seule étape de déprotonation est nécessaire (Xiao et al., 2005). Ces données suggèrent donc que KMTox catalyse préférentiellement le transfert de deux ou trois groupements méthyles sur des résidus lysine des histones H4 et H2A.

Par ailleurs, nous observons qu'en conditions réductrices (ajout de DTT) l'activité enzymatique augmente sensiblement sur l'histone H4, et plus significativement sur l'histone H2A. Mais l'efficacité de la réaction reste inchangée en conditions oxydantes *in vitro* (Figure 4E, Sautel et al. 2008). Le DTT pourrait agir directement ou indirectement sur KMTox. Une hypothèse serait d'avancer que le DTT a un effet sur le réarrangement du domaine SET, ce qui favorise la fixation du peptide pour que la lysine soit efficacement méthylée. Une autre

hypothèse attractive serait que l'augmentation de l'activité enzymatique en présence de DTT est la conséquence d'une modification de l'état redox de TgPrx1 et de son activité sur KMTox. D'autres expériences seront nécessaires pour mieux comprendre le mécanisme par lequel TgPrx1 pourrait réguler l'activité méthylase de KMTox *in vivo*.

3. Identification des gènes cibles de KMTox

Afin de caractériser la fonction de KMTox *in vivo*, nous avons réalisé une expérience de « ChIP-on-Chip array » avec une lignée RH exprimant ectopiquement KMTox-HAMyc (Figure 18). La localisation de KMTox sur le génome de *T. gondii* par ChIP-on-Chip montre une localisation préférentielle de l'enzyme au niveau de régions euchromatiques. Environ 21% des gènes cibles de KMTox sont impliqués dans la réponse au stress oxydant chez le parasite. Chez *T. gondii* 18 gènes anti-oxydants ont été identifiés (Ding et al., 2004; Deponte et al., 2007) et seulement cinq ne sont pas sous le contrôle de KMTox, parmi lesquels on retrouve TgPrx1, trois enzymes mitochondriales et une apicoplastique (Table1, Sautel et al. 2008). KMTox cible également des gènes impliqués dans la régénération du NADPH qui est essentiel à l'homéostasie globale de la cellule (6%), ainsi que des régulateurs de remodelage de la chromatine (18%) et des facteurs généraux de transcription (12%) (Table 1 Figure supplémentaire, Sautel et al. 2008). La cartographie des sites de liaison de KMTox suggère fortement un rôle de la méthylase dans l'homéostasie redox intracellulaire chez *Toxoplasma gondii*. Nous avons ensuite cherché à perturber la localisation de l'enzyme *in vivo* en appliquant un stress H₂O₂ aux parasites et en analysant par Scanning ChIP la liaison de KMTox aux cibles identifiées. Les résultats ne montrent pas clairement de différences dans les profils d'enrichissement entre les parasites traités ou non (Données non montrées). L'action du H₂O₂ ne semble donc pas interférer avec la localisation de l'enzyme sur ses régions cibles ; ce qui à priori exclue une intervention directe de TgPrx1 sur le ciblage chromosomique de son partenaire.

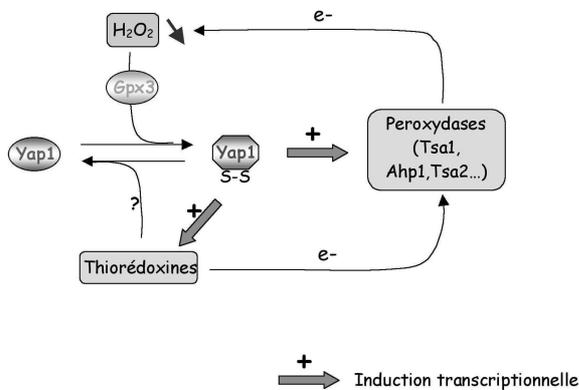
4. Discussion

4.1. KMTox/TgPrx1, complexe effecteur de la voie de signalisation des ROS

Les ROS, incluant l'eau oxygénée, le radical superoxyde et le radical hydroxyle, sont des sous-produits du métabolisme de l'oxygène produites dans toutes les cellules (Dalton et al., 1999). Elles peuvent également avoir une origine exogène. C'est le cas des ROS produites par la cellule hôte lors de l'explosion oxydative (« oxidative burst ») mise en place pour lutter contre les pathogènes. Les ROS sont généralement considérées comme cytotoxiques à cause des dommages oxydatifs qu'elles peuvent engendrer dans la cellule (Cerutti, 1985). Cependant à de faibles concentrations, les ROS peuvent aussi jouer le rôle de médiateurs physiologiques dans les réponses cellulaires (Dalton et al., 1999). Le H₂O₂ est une molécule relativement stable comparée aux autres ROS (demi-vie de 1 ms) et est capable de diffuser au travers des membranes cellulaires (Bienert et al., 2006). Ces caractéristiques lui permettent de jouer un rôle majeur dans la signalisation cellulaire au cours du développement (Finkel and Holbrook, 2000; Neill et al., 2002; Van Breusegem and Dat, 2006). Les voies de signalisation induites par le H₂O₂ conduisent à la mise en place des réponses biologiques adaptées. Ces voies de signalisation impliquent des senseurs ou des récepteurs, des protéines kinases activées par des agents mitogènes ainsi que des facteurs de transcription. Ces voies de signalisation semblent être relativement conservées au cours de l'évolution (Vandenbroucke et al., 2008). Ainsi, les Prxs n'ont pas uniquement un rôle d'antioxydant, elles ont également un rôle de médiateur du signal dans des voies utilisant l'eau oxygénée comme messenger. (Wen and Van Etten, 1997; Rhee, 1999; Wood et al., 2003a; Kang et al., 2005). Les Prxs sont impliquées dans la régulation de processus cellulaires importants comme la transcription, l'apoptose, et la signalisation cellulaire

L'interaction entre une enzyme du remodelage chromatinien KMTox et une enzyme du stress oxydant TgPrx1 au delà de son originalité s'inscrit dans un cas de signalisation redox intracellulaire bien connu, celui de *S. cerevisiae* (Delaunay et al., 2002). Cette levure possède un système détectant spécifiquement les peroxydes. Ce système comprend un détecteur, Gpx3, et un régulateur Yap1. Le facteur de transcription Yap1 contrôle l'expression de nombreux gènes, comme ceux responsables de la réduction du peroxyde d'hydrogène et de l'ion superoxyde (O₂⁻) (Delaunay et al., 2002; Wood et al., 2004). L'activité de Yap1 est régulée par sa localisation subcellulaire. En absence de H₂O₂, Yap1 est associé à Gpx3 et décrit un cycle entre le noyau et le cytosol grâce à l'importine Pse1 et l'exportine Crm1. La détection

du H₂O₂ par Gpx3 entraîne la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre Yap1 et Gpx3. La résolution rapide de ce pont en un pont intramoléculaire dans Yap1 entraîne la réduction concomitante de Gpx3. L'oxydation de Yap1 masque le NES (Nuclear Export Signal). Yap1 n'est plus capable d'interagir avec l'exportine Crm1 et s'accumule dans le noyau, où il induit l'expression de ses gènes cibles. Ainsi, Gpx3 détecte et transmet spécifiquement le signal H₂O₂ à Yap1 par le transfert d'un état redox. L'activité de Yap1 est soumise à un rétrocontrôle négatif, impliquant vraisemblablement une réduction par les thiorédoxines dont l'expression est contrôlée par Yap1. Le système Yap1/Gpx3 suggère que chez *S. cerevisiae*, la concentration intracellulaire en peroxydes est soumise à un contrôle homéostatique (Delaunay et al., 2002).



Modèle d'action du facteur de transcription YAP1.

L'oxydation de YAP1 par Gpx3, le senseur d'H₂O₂ conduit à une activation du facteur de transcription par son internalisation dans le noyau (Delaunay et al., 2002).

Par analogie, nous pensons que TgPrx1, à l'image de Gpx3, serait chez *Toxoplasma gondii*, le senseur des peroxydes et KMTox l'enzyme qui module l'activité génique, via la méthylation des histones. À la différence de YAP 1, KMTox est toujours nucléaire (Figure 1A et Supplémentaire 2 , Sautel et al. 2008). L'interaction de TgPrx1 avec KMTox n'interviendrait donc pas dans la régulation de la localisation sub-cellulaire de cette dernière. Les 2-Cys Prx1 ne sont pas exclusivement cytoplasmique. (Mu et al., 2002; Immenschuh et al., 2003; Kato et al., 2005; Kato et al., 2006). Il a ainsi été montré que la liaison de 2-Cys Prx1 à des protéines nucléaires comme c-Abl et c-Myc régule leur fonction dans le cycle cellulaire (Wen and Van Etten, 1997; Mu et al., 2002). Nos immunomarquages montrent que TgPrx1 est cytoplasmique et nucléaire. Une fraction importante de l'enzyme colocalise avec KMTox au niveau du noyau. Nous savons que l'interaction entre TgPrx1 et KMTox est favorisée par une élévation de la concentration en H₂O₂ sans influence sur la localisation subcellulaire de KMTox. TgPrx1 ne semble pas non plus agir au niveau de l'adressage de KMTox à ses gènes cibles. L'hypothèse retenue ici est donc que TgPrx1 en se liant à KMTox

module son activité KMT. Ce mode d'action existe chez les plantes, où les 2-Cys Prx peuvent être impliquées dans la régulation spécifique d'activités enzymatiques (Caporaletti et al., 2007). Dans cette étude de Caporaletti D et al., ils montrent que la régulation de l'activité CFBPase (une enzyme essentielle de la photosynthèse) repose sur la modification de l'état redox de l'enzyme par Prx.

Les 2-Cys Prxs sont des dimères obligatoires dont le mode d'action a été relativement bien décrit. Pendant la réaction catalytique, la cystéine Cp-SH est oxydée pour donner un acide sulfénique (Cp-SOH) qui, lorsqu'il interagit avec la cystéine Cr-SH de l'autre sous-unité du dimère, va former un disulfide. Ce disulfide sera ensuite réduit par une thiorédoxine ou une autre enzyme oxydoréductase (Figure 22a) (Kang et al., 2005). Ce mécanisme a permis de comprendre comment les 2-Cys Prxs sont mises à contribution de manière différente dans les voies de détoxification des ions peroxydes et dans les voies de transduction de signal. Dans une cellule normale, les 2-Cys Prxs sont présentes en grande quantité et maintiennent la concentration en ions peroxydes intracellulaires à un niveau bas. L'augmentation de la concentration intracellulaire en ions peroxydes conduit à l'hyper-oxydation irréversible de la cystéine Cp ; ce qui conduit à une inactivation des 2-Cys Prxs (Figure 22a) (Rabilloud et al., 2002; Kang et al., 2005). Cela a été observé *in vivo*, lors de l'activation des voies de signalisation dépendantes des ions peroxydes suite à un traitement des cellules au TNF (Rabilloud et al., 2002). L'hyper-oxydation irréversible conduit à la formation d'un décamère stable exerçant potentiellement d'autres fonctions spécifiques, comme interagir avec des protéines membranaires ou des enzymes (Wood et al., 2002; Barranco-Medina et al., 2008). En effet, les 2-Cys Prx inactivées ont alors un rôle de chaperones et agissent en tant que messenger (Claiborne et al., 2001; Delaunay et al., 2002; Moon et al., 2005). Pour compenser la faible activité des 2-Cys Prx-inactivées dans le contrôle de la concentration en ions peroxydes, les glutathiones peroxidases et catalases prennent le relais pour enrayer l'effet toxique des ROS générées (Wood et al., 2003a). Ainsi, les formes décamériques semblent agir comme des senseurs redox spécifiques dans la signalisation cellulaire (Barranco-Medina et al., 2008). Le passage de la forme dimérique à la forme décamérique pourrait être un des mécanismes régulateurs des interactions protéine-protéine dans lesquelles sont engagées ces enzymes (Matsumura et al., 2008). La conversion entre les deux formes est influencée par l'état redox ou la concentration en protéines (Barranco-Medina et al., 2008). La formation des décamères est favorisée en conditions réductrices ou hyperoxydées. Or dans nos essais

enzymatiques *in vitro*, l'ajout de DTT favorise l'activité enzymatique de KMTox. Nous pouvons spéculer que le DTT agit indirectement sur KMTox en favorisant la décamérisation de TgPrx1 (Figure 4E, Sautel et al. 2008). On peut alors imaginer qu'en situation de stress H_2O_2 , l'hydroxydation de TgPrx conduit à la formation de décimères et à l'inactivation de l'activité peroxydase de TgPrx ; ce qui favorise son interaction avec KMTox. Cette interaction engendre alors une modification de l'état redox de KMTox et se traduit par une augmentation de son activité KMT. La co-purification de TgPrx1 et KMTox dans un complexe de haut poids moléculaire conforte cette hypothèse (Figures 1C et 2B, Sautel et al. 2008). Reste à savoir TgPrx1 peut s'inscrire dans ce modèle d'inactivation de l'activité peroxydase au profit d'un rôle de chaperone.

Ce mécanisme d'inactivation des 2-Cys Prxs, lorsqu'elles sont mobilisées dans les voies de signalisation médiées par le H_2O_2 , est conservé des mammifères aux plantes en passant par la levure. Par contre, les 2-Cys Prxs bactériennes semblent plus robustes et maintiennent leur activité à des concentrations très élevées en ions peroxydes ($>1mM$) (Wood et al., 2003a). Les comparaisons de séquence et de structure des 2-Cys Prxs a permis d'identifier 2 motifs impliqués dans les propriétés de sensibilité à l'inactivation : les motifs Gly-Gly-Leu-Gly (GGLG) et Tyr-Phe (YF) (Wood et al., 2003a; Jonsson et al., 2008). Ces 2 motifs sont présents dans les 2-Cys Prxs classiques de la plupart des eucaryotes sauf chez certains parasites protozoaires comme les Kinetoplastidae, les Plasmodia et Giardia (Wood et al., 2003a; Jonsson et al., 2008). Ces parasites, certaines protéobactéries et cyanobactéries possèdent divers séquences intermédiaires pour lesquelles la sensibilité à l'hyper-oxydation n'est pas connue. Chez *Toxoplasma gondii*, TgPrx1 possède un motif GGIG analogue à GGLG (Figure 22b). Cela peut impliquer une sensibilité de la protéine à l'hydroxydation, à l'image de celles de la plupart des eucaryotes ; cependant ces données ne permettent pas de conclure sur la capacité d'inactivation de TgPrx dans le parasite et nécessitent d'autres investigations.

4.2.Interaction KMTox/Prx1 et physiopathologie

Dans les modèles d'infection aigüe chez la souris le stress oxydatif produit par les macrophages activés a un effet important sur les parasites (Shrestha et al., 2006). Ainsi l'invasion de cellules ne produisant pas de ROS (ROS-) corrèle avec une prolifération intensive des parasites (2 cycles de division ou plus) alors que les cellules produisant des ROS

(ROS+) sont résistantes à l'infection *in vivo*. Si les mécanismes sont mal compris, échapper à l'action des ROS produites lors de l'explosion oxydative *in vivo* semble une stratégie nécessaire à la survie et à la prolifération parasitaire. Deux hypothèses non exclusives peuvent être formulées sur la réponse du parasite aux ROS. La première est que *Toxoplasma gondii* résiste aux ROS produites, grâce à un système de détoxification efficace, et peut ainsi proliférer. La seconde hypothèse est que le parasite interfère avec la cellule hôte et module la production de ROS.

Plusieurs arguments soutiennent la première hypothèse. Pour neutraliser l'effet toxique du stress oxydatif et des espèces réactives de l'oxygène, le parasite possède une batterie d'enzymes antioxydantes dont 3 superoxyde dismutases, une catalase et plusieurs glutathiones et thioredoxines peroxidases putatives de la famille des peroxiredoxines (Son et al., 2001; Brydges and Carruthers, 2003; Ding et al., 2004). De plus, nos résultats de CHIP-on-Chip montrent que 21% des gènes cible de KMTox sont impliqués dans la réponse au stress oxydant (Table 1 et Table Supplémentaire 1, Sautel et al. 2008). Ceci suggère que TgPrx1 pourrait contribuer, via KMTox, à la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la voie de réponse au stress oxydant. Le stress oxydatif serait alors un signal moléculaire, qui se traduirait dans notre modèle par des modifications post-traductionnelles des histones qui influenceraient l'expression des gènes de réponse au stress oxydant. L'analyse comparative des transcriptomes induits ou non par le H₂O₂ montre qu'il existe des voies de régulation conservées et des spécificités propres à chaque espèce (Vandenbroucke et al., 2008). Par exemple, l'expression des gènes antioxydants est induite par le stress H₂O₂ exclusivement chez les organismes unicellulaires. Cette différence peut être liée aux variations extrêmes et imprévisibles des concentrations en ROS auxquelles les microorganismes peuvent être exposés dans leur habitat écologique. Ce mode de vie exige des capacités d'adaptations très grandes. Les mammifères ne sont pas soumis à de telles variations. Aussi, l'expression constitutive d'un système de défense est suffisante pour réguler efficacement la concentration en H₂O₂ intracellulaire. *Toxoplasma gondii* avec son cycle de division intracellulaire passe une grande partie de sa vie au sein de la vacuole parasitophore. Ce compartiment est une interface de protection du parasite et semble l'affranchir de variations extracellulaires extrêmes. Ce mode de vie intracellulaire laisse supposer l'expression constitutive d'un système de défense antioxydant. Cependant la plupart de nos expériences (purification du complexe, CHIP) ont été réalisées à partir de parasites extracellulaires n'ayant a priori pas été

soumis à un stress oxydant. Mais le milieu de culture utilisé pour l'amplification parasitaire sur tapis de cellules HFFs contient des facteurs de croissance cellulaire apportés par le sérum de veau fœtal comme l'EGF (facteur de croissance épidermique), le FGF (facteur de croissance fibroblastique) le PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes) et l'IL-2 (Interleukine 2). Or dans les cellules de mammifère, le PDGF et l'EGF induisent une augmentation transitoire de la concentration intracellulaire en H₂O₂ (Meier et al., 1989; Lo and Cruz, 1995; Sundaresan et al., 1995; Bae et al., 2000). Les parasites extracellulaires peuvent alors être directement exposés à la libération de ROS dans le milieu par les cellules fraîchement lysées. Or nous savons que l'interaction KMTox/TgPrx1 est amplifiée par l'ajout de H₂O₂ dans le milieu (Figure 2C, Sautel et al. 2008). Les ROS libérées par les cellules hôtes après egress du parasite pourraient être suffisantes à la préactivation de l'association de TgPrx1 à l'enzyme KMTox. Cette préactivation peut expliquer la difficulté à augmenter l'enrichissement de la chromatine liée à KMTox par Scanning CHIP après traitement au H₂O₂. Le système serait déjà saturé par les ROS libérées par les cellules, voire le milieu de culture comme suggéré par Halliwell B et al. (Halliwell, 2003). Nous avons vu que différentes concentrations en H₂O₂ conduisent à différentes réponses cellulaires, en particulier détoxification versus signalisation. La concentration en ions peroxydes dans nos conditions de travail a donc une importance majeure dans la formulation de nos conclusions.

La seconde hypothèse quant à la réponse de *Toxoplasma gondii* aux ROS, considère que l'infection est un phénomène actif dans lequel le parasite élabore une stratégie de contrôle de sa cellule hôte pour assurer sa survie. Il a été montré que le parasite module la signalisation intracellulaire ; ce qui conduit, par exemple, à inhiber partiellement l'apoptose de la cellule hôte ou à moduler la production de cytokines (Nash et al., 1998; Denkers et al., 2003; Saeij et al., 2007) . Nos données de CHIP-on-Chip pourraient entrer dans le cadre de ce modèle de manipulation de la cellule hôte par le parasite. En effet, KMTox se lie à proximité de nombreux gènes et pas exclusivement auprès de ceux impliqués dans la détoxification en ROS. L'enzyme semble être au centre d'un régulon génique complexe (Table 1 Figure supplémentaire, Sautel et al. 2008). Des études chez les bactéries, les levures ou les eucaryotes supérieurs montrent clairement qu'une augmentation du niveau d'H₂O₂ cellulaire influe considérablement sur le transcriptome et module l'expression de centaines de gènes (Gasch et al., 2000; Zheng et al., 2001; Chuang et al., 2002; Chen et al., 2003; Lee et al., 2003; Desaint et al., 2004; Girardot et al., 2004; Kobayashi et al., 2004; Li et al., 2004;

Mostertz et al., 2004; Murray et al., 2004; Davletova et al., 2005; Stanley Kim et al., 2005; Vanderauwera et al., 2005). Le H₂O₂ n'affecte pas exclusivement les gènes de détoxification en ROS mais régule également l'expression de gènes impliqués dans la transduction de signal, la régulation de la transcription, et le métabolisme des protéines, des carbohydrates ou des lipides. Nos données de ChIP-on-Chip, corrélient avec ce type de signalisation complexe (Table 1 Figure supplémentaire, Sautel et al. 2008). Ainsi, KMTox est présente à proximité de gènes codant les ARN polymérase I, II et III, ainsi que des facteurs généraux de l'initiation et de l'élongation de la transcription (Table 1 Figure Supplémentaire, Sautel et al. 2008). Sa présence à proximité de la lysine méthyltransférase TgSET2 est un autre lien au processus d'élongation. En effet, le processus d'élongation de la transcription fait intervenir la méthylation du résidu K36 de l'histone H3 par la famille SET2. Cette marque épigénétique empêche les événements de ré-initiation de la transcription en amont du complexe d'élongation, via le recrutement d'un complexe répresseur Rpd3S (voir Chapitre I, 4.3) (Li et al., 2007). De plus, KMTox occupe de vastes régions de chromatine qui s'étendent au delà des régions « promotrices » et plus particulièrement à l'intérieur des séquences codantes. Un rôle dans le contrôle de l'élongation n'est donc pas à exclure. KMTox est aussi présente dans l'environnement de gènes codants des facteurs de remodelage physique ou chimique de la chromatine, comme le répresseur transcriptionnel SIR2 (Table 1 et Table 1 Figure supplémentaire, Sautel et al. 2008). En régulant SIR2, KMTox pourrait élargir son réseau de régulation. Ainsi, la mise en place de ce réseau complexe pourrait se traduire par la subversion de la cellule hôte par le parasite afin d'inhiber, par exemple, la production de ROS.

5. Conclusion et Perspectives à court terme

L'interaction TgPrx1-KMTox soulève plusieurs questions quant à la pertinence de ce duo *in vivo*. Ce complexe pourrait intervenir dans le maintien de l'homéostasie intracellulaire. L'origine des ROS dégradées par TgPrx1 peut être liée au métabolisme endogène du parasite. Dans les parasites Apicomplexes, les ROS issus du métabolisme endogène sont générées par l'activité de la mitochondrie et de l'apicoplaste (Sienkiewicz et al., 2004; Boucher et al., 2006; Pino et al., 2007). Une autre hypothèse est que le complexe TgPrx1-KMTox pourrait intervenir dans la résistance et/ou la mise sous silence de l'explosion oxydative dans les macrophages infectés (Hughes, 1988). En effet, lors de l'infection à *Toxoplasma*, le parasite entretient une relation stratégique avec les cellules hôtes afin de garantir sa prolifération. Les

enzymes de modifications des histones comme KMTox pourraient être des acteurs majeurs du déroulement de la phase aigüe de l'infection. Dans ce modèle, le senseur du stress oxydatif TgPrx1 transmettrait le signal à KMTox qui irait déclencher la régulation des gènes parasitaires pour répondre de manière ad hoc au stress et éventuellement stopper l'explosion oxydative. Cependant, il reste à démontrer que KMTox est impliquée dans la régulation de l'expression de gènes lors de la réponse au stress oxydant.

Dans un premier temps, afin de vérifier que KMTox est responsable de la résistance au H₂O₂, plusieurs approches sont envisageables. D'une part il serait intéressant d'étudier la sensibilité au H₂O₂ d'une lignée délétée de KMTox. Cependant, malgré les multiples tentatives, nous n'avons pas obtenu de lignée Knock Out de KMTox. Cela signifie possiblement que la délétion de cette enzyme soit létale. En effet, de nombreuses KMT sont décrites dans la littérature comme essentielles (O'Carroll et al., 2001; Peters et al., 2001). Par ailleurs, la lignée transgénique exprimant ectopiquement HAFlag-KMTox est hautement instable. En effet, nous avons observé une perte de l'expression de la protéine, sans doute due à une inactivation transcriptionnelle du transgène, après un mois de culture (8 passages). L'expression ectopique de KMTox sous son propre promoteur révèle une expression faible de la protéine (Figure 6A, Sautel et al. 2008). Une autre hypothèse serait donc que l'expression de ce gène est hautement régulée et interdit toute sur-expression. La réalisation d'un Knock Out inductible de KMTox permettrait de caractériser son rôle éventuel dans la résistance au stress oxydatif *in vivo* (Meissner M et al. 2002). Une autre stratégie consisterait à moduler la quantité de KMTox exprimée. Il a été montré que le système ddFKBP fonctionne chez *Toxoplasma gondii* (Banaszynski et al 2006). Dans ce système, la fusion d'un domaine de déstabilisation à la protéine d'intérêt permet de réguler rapidement et de façon réversible la quantité de protéines exprimées (Herm-Götz A, et al. 2007). De même, l'utilisation d'un mutant inactif, par mutation ponctuelle dans le site catalytique de KMTox, permettrait de vérifier que l'activité méthylase est responsable de la résistance au H₂O₂. D'autre part, la lignée surexprimant KMTox est plus résistante au H₂O₂ que les parasites WT. Il serait donc intéressant de regarder si la quantité de transcrits ou de protéines KMTox augmentent suite à un stress H₂O₂ dans une lignée sauvage. En effet, la surexpression de KMTox pourrait conduire un ratio KMTox/TgPrx1 non physiologique et mimer ainsi l'augmentation de la quantité d'enzyme lors d'une réponse au stress H₂O₂. De même, la simple surexpression de KMTox pourrait augmenter son adressage aux gènes cibles et se traduire par l'expression

constitutive des gènes cibles de KMTox. Cette hypothèse permettrait d'expliquer l'augmentation de la résistance au H₂O₂ du clone RH::KMTox, mais également la difficulté à augmenter l'enrichissement de la chromatine liée à KMTox par Scanning CHIP après traitement au H₂O₂ de la lignée surexprimant KMTox. Ainsi, en conditions de culture normales, le clone surexprimant KMTox pourrait être dans une configuration de réponse au stress permanente. Il serait donc intéressant de comparer la quantité d'ARNm transcrit à partir des gènes cibles de KMTox en conditions normales, entre la lignée WT et la lignée surexprimant KMTox ; et aussi en condition ou non de stress H₂O₂ sur des parasites WT. Ces dernières hypothèses montrent qu'il serait intéressant de reproduire les expériences avec une lignée exprimant moins fortement KMTox. La réalisation d'une lignée exprimant KMTox sous son propre promoteur nous a permis de vérifier la localisation exclusivement nucléaire de KMTox. Mais le niveau d'expression est tellement faible que nous n'avons pas utilisé cette lignée pour les expériences de biochimie. Cependant, il est envisageable de réaliser certaines expériences, comme le Scanning CHIP avec cette lignée KMTox sous promoteur endogène, afin de conforter et approfondir nos résultats.

Nos données ne nous permettent pas de conclure sur l'activité activatrice ou répressive de KMTox sur ses régions cibles. Pour déterminer le rôle de KMTox sur l'expression de ses cibles géniques, il est important de connaître précisément les résidus cibles de KMTox. Pour cela, il est indispensable de mieux comprendre les facteurs influençant l'efficacité de l'enzyme. Nous avons vu que les conditions de préparation des extraits parasitaires (extracellulaires, pH, environnement réducteur/oxydant...) pourraient moduler considérablement les résultats. Il serait donc intéressant de reproduire les expériences de Scanning CHIP et d'activité enzymatique dans des conditions différentes de préparation des extraits parasitaires. L'ajout d'H₂O₂ favorise l'interaction TgPrx1/KMTox, il serait donc intéressant d'utiliser des extraits provenant de parasites soumis à un stress H₂O₂. Enfin, Il faut garder à l'esprit que la capacité de KMTox de métyler spécifiquement les histones H4 et H2A peut cacher des activités antagonistes ; et que la liaison de KMTox à une région de chromatine ne signifie pas implicitement activation/répression génique. Il peut également s'agir d'une localisation constitutive permettant une réponse rapide par activation de l'enzyme. Enfin, la présence d'un taux d'acétylation élevé et l'absence de l'enzyme TgSET8 au niveau des loci de liaison de KMTox, suggère que l'enzyme est associée à une chromatine active.

En guise de conclusion

Dans l'introduction de ce manuscrit, nous avons émis l'hypothèse que la régulation transcriptionnelle chez *T.gondii* est dépendante des machineries de remodelage de la chromatine, et peu dépendante des facteurs de transcription spécifiques. *T. gondii*, et par extension son phylum, a développé une machinerie épigénétique sophistiquée, plus proche de celle de l'Homme que de celle de la levure. L'enzyme TgSET8 en est un exemple frappant. Ainsi *Toxoplasma gondii* possède de nombreuses enzymes catalysant le remodelage chimique et physique de la chromatine ainsi que des protéines lectrices reconnaissant ces modifications grâce à des domaines spécialisés. Le « code histone » du Toxoplasme est relativement complexe, ce qui constitue un moyen élaboré de moduler l'expression génique de façon fine et spécifique. En dehors des similitudes, il existe des différences significatives dans la distribution et la fonction des marques épigénétiques entre les plantes, les levures, la Drosophile ou les mammifères qui impliquent que le code histone n'est pas un langage universel, mais plutôt un ensemble de dialectes différents (Loidl, 2003). Reste à décrypter celui du Toxoplasme, voire des autres parasites du phylum. Il est donc indispensable de poursuivre les investigations sur les enzymes en charge du remodelage de la chromatine afin de décrypter les programmes épigénétiques qui régulent le cycle parasitaire si complexe, incluant le processus d'interconversion. Ces enzymes devraient s'avérer être des cibles intéressantes pour le développement de drogues. C'est le cas chez l'humain, où de nombreuses études se concentrent à identifier les épimutations responsables de la dégénération cellulaire. Les enzymes de remodelage de la chromatine deviennent des cibles intéressantes pour le développement de traitements anticancéreux.

Enfin, il est important de souligner qu'une modification d'histone doit être considérée dans son environnement propre afin de déterminer sa fonction biologique. En effet, nous avons vu l'importance des effets synergiques et antagonistes des modifications d'histones entre elles. Les outils de cartographie des modifications d'histones à l'échelle du génome apportent de belles perspectives de décryptage du code histone propre à chaque processus biologique.

Chapitre III : Matériel et méthodes

Partie 1 : Matériel

1. Amorces de clonage

	Primer 5'	Séquence Primer 5'	Primer 3'	Séquence Primer 3'
TgSet8ΔN1	TgSET12-AQY-PCR5-BamHI	ggatccGCCCAGTACGCGCCGAACCTCTTTTG	TgSET12-STOP-PCR3-HindIII	AAGCTTcgaaaacgcgagccTCAGCTGTC
TgSet8ΔN2	TgSET12-RGN-BamHI	ggatccCGAGGCAACAAGGACATCGAC	pET28a-PCR3	CGGATATAGTTCCTCCTTTTCAGCAAAAAAC
TgSet8ΔN3	TgSET12-ASR-BamHI	ggatccGCCTCGCGACGAACTGGGGAG	pET28a-PCR3	CGGATATAGTTCCTCCTTTTCAGCAAAAAAC
TgSet8ΔN4	TgSET12-EEK-BamHI	ggatccGAAGAGAAGGCACAACGGATG	pET28a-PCR3	CGGATATAGTTCCTCCTTTTCAGCAAAAAAC
TgSet8ΔN1 (V1875Y)	V 334Y-PCR5	GAGGAGCTGCTGtacGACTACGGCGAGCGT	V 334Y-PCR3	ACGCTCGCCGTAGTCgtaCAGCAGCTCCTC
TgSet8ΔN1 (F1808Y)	F273Y-PCR5	AGCTTCATGTaCTACTTCAAAAACGGGTCT	F273Y-PCR3	AGACCCGTTTTTTGAAGTAGtACATGAAGCT
Région chromosomique VI	TELOMERIC-ChrVI-PCR5	CAGGGTGCATGCCCCGGAACCTTGCGCTC	Telomerique-repeat-PCR3	CTAAACCCTAAACCCTAAACCCTAAAC
Répétition 350B	TgSAT350-1 B-PCR5	CGACTCGGACGTCAGGCCATGCAGAG	TgSAT350-1 B-PCR3	GCGCCTGAACAATACGCCCAACC
Répétition 529A	529-bp repeat-A-PCR5	CTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG	529-bp repeat-A-PCR3	CTGCAGACACAGTGCATCTGGATT
Région télomérique 995285	995285repeat-PCR5	GTCTCCCGCTTTTCGGCCTCATCTCCAG	995285repeat-PCR3	CTGTAAATCGCCTCTGAGCCTGTCC
5S rDNA	5S-PCR5	TGAACACAACCTCGCTTTTGC	5S-PCR3	GTCTGAAGGGATCCGGTGTA
17S rDNA	17S-PCR5	ACAATTGGAGGGCAAGTCTG	17S-PCR3	CTGCAGTATTCAAGGCGACA
ITS1 rDNA	ITS1-PCR5	TTTGCATTCAAGAAGCGTGA	ITS1-PCR3	GCACATCGAGAGAGATGCAG
KMTox	KMTox-BamHI:	GGATCCGAGATTTCGCGTGGAAACGAGAAAC	KMTox-ClaI	AGCGGCCGTTTAATCGATGGCTTTGAGAGA
TgPrx1	TgPrx1-BamHI	GGATCCCCGGCCCCGATGGTGTCTCAGCCAG	TgPrx1-EcoRI	GAATTCCTTGCTTCCGAGATACTCCTTAAC

La table M1 ci-dessus indique l'ensemble des amorces utilisées dans ces travaux.

2. Vecteurs de clonage

- Clonage de produits PCR : TOPO TA cloning (Invitrogen).
- Production de protéines recombinantes chez *E. coli* : pET28a (Novagen).
- Expression ectopique de protéines chez *T. gondii* : Le vecteur pMAH14 a été utilisé, il est issu d'une matrice pKS dans laquelle ont été ajoutés un promoteur fort GRA1, un terminateur SAG1 et la double étiquette HA-Flag en fusion traductionnelle. L'étiquette Flag permet de réaliser des immunoprécipitations sur résine anti-Flag suivie d'une élution avec le peptide compétiteur Flag (Sigma). Sur la même base, le vecteur pNS85 possède la double étiquette HA-Myc à la place de la double étiquette HA-Flag. L'étiquette Myc permet de réaliser des expériences d'Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). L'étiquette HA, commune aux deux vecteurs est utilisée pour les immunomarquages avec les anticorps anti-HA.

3. Enzymes utilisées

- Reverse transcription : reverse transcriptase Superscript III (Invitrogen).
- Amplification par PCR : TAQ DNA polymerase Dynazyme EXT (Finnzyme).
- Ligation de fragments d'ADN dans un vecteur d'intérêt : T4 DNA ligase (Biolabs).
- Digestion de fragments d'ADN : Enzymes de restriction (Fermentas).

4. Préparation d'ADN plasmidique et d'ARN totaux de tachyzoïtes

Les mini-préparations d'ADN plasmidique sont effectuées avec le kit NucleoSpin Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel) d'après les recommandations du fournisseur. Les plasmides d'intérêts sont purifiés en grande quantité par Maxiprep avec le kit Nucleobond (Macherey-Nagel). Le séquençage des molécules d'ADN est réalisé par les compagnies Genome express ou GATC. Les ARN totaux de tachyzoïtes sont extraits avec le kit Qiagen RNeasy Minikit.

5. Souches bactériennes

- TOP10F' : F' {*lacI*^q, Tn10(Tet^R)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*.
- BL21 (DE3) : F⁻ *ompT* *hds_{SB}*(*r_m^{B-}* *B⁻*) *gal* *dcm* (DE3)

Les souches bactériennes sont rendues compétentes et transformées par choc thermique selon les protocoles de Sambrook et Russell.

6. Culture *in vitro* des parasites

Nous avons utilisé la souche de toxoplasme RH, de type I, non kystogène pour l'ensemble des extractions d'ARN ou de protéines et la souche RH Δ hxgprt, déficiente pour l'enzyme hypoxanthine-xanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase pour les manipulations génétiques (Donald et al., 1996). Les parasites sont maintenus et amplifiés par infections de cellules humaines adhérentes HFF (Human Foreskin Fibroblasts) et Hela (Human Epithelial cells cervical carcinoma) jusqu'à lyse complète du tapis cellulaire. Les cellules infectées ou non par les parasites sont cultivées à 37°C, sous 5 % de CO₂, en milieu DMEM (Dulbecco Minimum Essential Medium, Gibco) à 10 % de sérum de veau foetal (SVF) (Gibco ref. 10270-106), 2 mM de Glutamine (Euromedex), 50 U/ml de Pénicilline et de 50 µg/µl de Streptomycine (Dutscher). Pour le stockage des lignées parasitaires, les parasites sont congelés au stade intracellulaire en DMEM à 20 % SVF et 10 % de DMSO à -80°C puis dans l'azote liquide. Les parasites intracellulaires sont collectés par rupture de l'adhérence du tapis cellulaire avec 0,5 % de trypsine dans du PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco).

7. Anticorps

La table M2 ci-dessous indique les anticorps primaires utilisés en immunofluorescence, western-blot, immunoprécipitation et FACS avec leur provenance et la dilution à laquelle ils ont été utilisés.

	Provenance	Immuno-fluorescence	Immuno-histochimie	Western Blot	Immuno-precipitation	FACS
α -TgPrx1 polyclonal de lapin	Son et al., 2001	1 : 1000		1 : 1000		
α -TgPrx2 polyclonal de lapin	Akerman et al., 2005	1 : 1000		1 : 1000		
α -KMTox-polyclonal de lapin	Eurogentec	1 : 1000		1 : 1000	Yes	
α -HA Serum de lapin, polyclonal	Eurogentec	1 : 1000		1 : 1000		

	Provenance	Immuno- fluorescence		Western Blot	Immuno- precipitation	FACS
α -HA Serum de rat, monoclonal	Roche Diagnostic	1 : 1000		1 : 1000		1 : 500
α -Flag monoclonal	SIGMA	1 : 1000				
α -IMC1, Monoclonal	Ward G, (Mann and Beckers, 2001)	1 : 2000				
α H4K20-me1, polyclonal	Abcam 9051-100	1 : 500	1 : 250		Yes	1 : 250
α H4K20-me2, Polyclonal anti	Abcam 9052	1 : 500		1 : 1000	Yes	
α H4K20-me3, Polyclonal anti	Abcam 9053	1 : 1000	1 : 500		Yes	
α -H4K20-me1, Polyclonal	Rice JC, (Sims et al., 2006)			1 : 150000	Yes	
α -H4K20-me2, Polyclonal	Rice JC, (Sims et al., 2006)			1 : 100000	Yes	
α -H3S10P, monoclonal	Abcam 14955-100	1 : 500				
α -CC2 monoclonal	W. Bohne (Gross et al. 1995)	1 : 500	1 : 1000			
α -H3K4-me2, polyclonal	Upstate	1 : 1000				
α H4, Polyclonal	Abcam 4559			1:1000		
α -AcH4 (α -H4K5K8K12K16-Ac), polyclonal	Upstate	1:1000				
α -H3K9-me1	upstate 07-450	1 : 250		1 : 1000	Yes	
α -H3K9-me2	upstate 07441	1 : 250		1 : 1000	Yes	
α -H3K9-me3	upstate 07442	1 : 250		1 : 1000	Yes	
α -TgSET8 (79) serume de lapin, Polyclonal	Eurogentec	1 : 500		1 : 1000		
α - <i>Toxoplasma gondii</i> serume de lapin, Polyclonal	Pelloux H, Parasitologie-Mycologie CHU Grenoble					1 : 300
α -Myc, Monoclonal	9E10 - sc40X, Santa-Cruz Bio				Yes	

Table M2.

La table M3 ci-dessous indique les anticorps secondaires utilisés en Immunofluorescence, Western Blot et cytométrie de Flux.

Utilisation	Type d'anticorps	Provenance	Dilution
Anticorps secondaires conjugués à la phosphatase alcaline, utilisés en western-blot	IgG (Fc) Conjugué à la phosphatase alcaline anti-IgG de lapin S3731	Promega	1 : 5000
	IgG (H+L) Conjugué à la phosphatase alcaline anti-IgG de souris S3721	Promega	1 : 5000
Anticorps secondaires conjugués à un fluorochrome utilisés en immunofluorescence et FACS	Alexa Fluor® 488-anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) de souris (vert)	Invitrogen	1 : 1000
	Alexa Fluor® 488-anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) de lapin (vert)	Invitrogen	1 : 1000
	Alexa Fluor® 594-anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) de souris (rouge)	Invitrogen	1 : 1000
	Alexa Fluor® 594-anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) de lapin (rouge)	Invitrogen	1 : 1000
	Alexa Fluor® 633 anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) de lapin (bleu)	Invitrogen	1 : 1000

Table M3.

Partie 2 : Méthodes

1. Méthodes de biologie moléculaire

Les ADNc de TgSET13 (KMTox) et de TgSET8 sont amplifiés par RT-PCR à partir d'ARN totaux de tachyzoïtes et sous-clonés dans les vecteurs d'expression bactérien (pET28a) et parasitaire (pMAH14 ou pNS85). La table M1 résume l'ensemble des amorces utilisées pour ces travaux. La table M4 reprend l'ensemble des vecteurs construits pour les différents projets avec les enzymes de restrictions utilisées pour chaque construction.

La construction des vecteurs a été réalisée par les techniques classiques de biologie moléculaire : PCR, digestion d'ADN, purification des fragments d'ADN sur gel, extraction des fragments d'ADN (Kit NucleoSpin Extract II), ligation, transformation des bactéries et purification de l'ADN vectorisé par minipréparation d'ADN.

2. Méthodes de biologie cellulaire

2.1. Obtention de lignées parasitaires recombinantes stables

Les parasites sont transfectés par électroporation lorsqu'ils sont extracellulaires (Roos et al., 1994). La souche utilisée pour réaliser des lignées recombinantes est la souche RH Δ hxgprt, n'exprimant pas l'enzyme hypoxanthine-xanthine-phosphoribosyl-transférase. La co-transfection du plasmide pmini/HXGPRT dans des proportions 1:10 permet de sélectionner les parasites ayant intégré les constructions transfectées, sous l'action de l'acide mycophénolique à 25 μ g/mL (Donald et al., 1996). L'acide mycophénolique ajouté dans le milieu de culture bloque la seule voie de synthèse des purines chez les toxoplasmes Δ hxgprt. Par contre, les parasites ayant intégré le plasmide pmini/HXGPRT codant l'enzyme HXGPRT, survivent à l'acide mycophénolique en synthétisant les purines à partir de xanthine ajoutée au milieu de culture (50 μ g/mL). Les toxoplasmes sont ensuite clonés par dilution limite (1 parasite par puits, dans des plaques de culture de 96 puits contenant des cellules HFF confluentes). Les plaques sont incubées pendant 5 jours puis observées au faible grossissement (x2.5) de façon à cribler les puits où une seule plage de lyse s'est développée. Les clones sont transférés en plaques de 24 puits après prolifération des parasites et lyse du tapis cellulaire. Les clones isolés sont criblés par immunofluorescence α HA afin d'identifier les clones exprimant la protéine d'intérêt en fusion avec l'étiquette HA.

2.2. Immunofluorescence

Des cellules HFF sont cultivées jusqu'à confluence sur des lamelles de verre traitées pour la culture cellulaire, en plaques 24 puits et infectées par une suspension parasitaire. 24h après l'invasion, le tapis cellulaire infecté est fixé au formaldéhyde 2,5% pendant 15 min. Les parasites au stade extracellulaire sont fixés après adhésion sur des lamelles de HFF, par un pulse de 1 min à 400g. La perméabilisation des cellules est nécessaire pour permettre le marquage des différentes structures. Le traitement au triton X-100 0,1% conduit à une perméabilisation totale de la cellule hôte et des parasites. Les lamelles sont ensuite saturées avec un tampon de saturation à 5%SVF et 5% sérum de chèvre. La détection des protéines d'intérêt se fait par immunomarquage. Les lamelles sont incubées avec un anticorps primaire spécifique puis avec un anticorps secondaire de type Alexa (Invitrogen, Molecular Probes) (table M3). Les lamelles sont montées sur lame à l'aide d'un liquide de montage (Mowiol) et observées au microscope droit Axioplan 2 (Zeiss). Les photographies sont réalisées avec une caméra AxioCam MRm (Zeiss) couplée au logiciel d'acquisition axiovision 4.5.

2.3. Traitement des parasites au H₂O₂

Les parasites fraîchement sorits sont collectés par centrifugation à 850g, lavés deux fois en milieu frais sans sérum et traités avec différentes concentrations de H₂O₂ (10µM-100mM) pendant 1-3h à 37°C avec 5% de CO₂. Les parasites, traités ou non sont lavés et mis en culture sur un tapis de cellules HFF sur lamelle par un pulse de 30 secondes à 400g. Les parasites n'ayant pas envahi les cellules sont retirés par 2 lavages avec du PBS, 2h après le pulse d'invasion. L'effet du traitement H₂O₂ sur la survie des parasites est mesuré 24-48h après l'invasion. Les lamelles sont fixées et le nombre de vacuoles formées est compté au microscope.

Pour comparer la résistance au H₂O₂ de la lignée RH sauvage et de la lignée surexprimant l'enzyme KMT_{ox}, les parasites ont été traités avec 200µM de H₂O₂ pendant 3h à 37°C. 24h après l'invasion le nombre de vacuoles est compté pour un même nombre de champs criblés pour chaque souche.

2.4. FACS

Pour l'analyse du niveau d'expression de protéines au cours du cycle de division parasitaire, nous avons utilisé des parasites au stade intracellulaire (8 à 32 parasites par vacuole). Les tapis de cellules infectées sont décollés mécaniquement avec un grattoir,

seringués avec une aiguille de 25g afin de rompre les vacuoles, filtrés avec des membranes Nucléopore (Whatman) d'une porosité de 3µm afin d'éliminer les débris cellulaires. Après centrifugation 10 min à 850g, les parasites sont repris en PBS pour être fixés pendant 2h dans une solution à 8% de formaldéhyde et 10% de méthanol. Les parasites sont lavés en PBS par centrifugation en tubes coniques. Le marquage des protéines d'intérêt se fait par immunomarquage dans un volume minimum (500µl). Les parasites sont perméabilisés 15 min avec 0,1% de Triton, saturés avec 5% de SVF et 5% de sérum de chèvre. Les parasites sont incubés sous agitation douce pendant 1 h, avec un anticorps primaire spécifique puis avec un anticorps secondaire de type Alexa (Invitrogen, Molecular Probes) (table M3). Enfin les extraits parasitaires sont soumis à un traitement RNase 250U/ml de 30 min à 37°C (RNase cocktail ambion AM2286) et l'ADN est marqué avec 10µg/ml d'Iodure de Propidium (Sigma P4170) par une incubation de 15 min à l'obscurité. Les parasites immunomarkés sont analysés au cytomètre de flux (FACS Calibur) et les données sont traitées avec le logiciel CellQuest Pro. Le marquage spécifique anti-toxoplasme permet de réaliser une fenêtre autour des parasites afin d'exclure au maximum les débris cellulaires résiduels (Protocoles supplémentaires, Sautel et al. 2007).

3. Méthodes de biochimie

3.1. Analyse d'extraits protéiques

Les protéines sont séparées par SDS-PAGE (gel gradient 4-12% Bis-Tris NuPAGE, migration en tampon de migration SDS-MES, Invitrogen) révélées par coloration au nitrate d'argent (ProteoSilver Plus Kit, Sigma) ou coloration au bleu de Colloïdal (Colloïdal Blue Staining Kit, Invitrogen). Des Western blot sont réalisés pour les détections spécifiques. Après une étape de transfert à 110V, de 1h pour les petites protéines comme les histones (<20KDa), à 2h pour les grosses protéines (>100KDa), la membrane de PVDF est saturée dans du TTBS contenant 5% de lait (m/v) pendant 1h sous agitation afin de bloquer les sites de liaison des anticorps aspécifiques. Puis la membrane est incubée dans une solution de TTBS contenant l'anticorps primaire. Ensuite la membrane est incubée dans l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (Table M3) après plusieurs lavages de 15 min en TTBS. Après 1h d'incubation sous agitation constante, la membrane est lavée 3 fois 15 min en TTBS. Les protéines détectées par les anticorps sont alors révélées avec une solution de BCIP/NBT (BCIP : 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate ; NBT : Bitro Blue Tetrazolium).

3.2. Purification d'anticorps sur colonne d'affinité

L'immunopurification d'anticorps à partir de serums de lapins immunisés (Eurogentec) avec des protéines recombinantes d'*E.coli* est réalisée par colonne d'affinité. La résine Affigel (Biorad) est choisie selon le point isoélectrique (pI) de la protéine antigène, Affigel 10 ($6 < pI < 12$) ou Affigel 15 ($4 < pI < 6.5$). La solution d'antigène est préparée dans un tampon dépourvu de groupements amines (sans Tris), par dialyse contre du tampon HEPES. Les antigènes sont dilués dans un tampon 100mM HEPES pH8 afin d'obtenir un ratio de 1 à 6 mg d'antigènes par ml de résine Affigel. La solution d'antigènes est incubée avec la résine pendant 4h à 4°C sous agitation douce (roue à 5rpm). L'excédant d'antigène non lié est retiré, et la résine est saturée par incubation pendant 1h à 2h avec un tampon Tris (1M Tris pH8) sous agitation douce. La résine est lavée avec 10 à 20 volumes de colonne (CV) de tampon BC500 (20 mM Tris-HCl pH8 ; 0.2 mM EDTA, 10% glycerol et 500 mM KCl) et avec 10 CV de PBS. Les anticorps sont alors purifiés sur la résine saturée en Ag par incubation sur la nuit à 4°C sous agitation douce. L'excédant d'anticorps est retiré, la résine est lavée avec 10 à 20 CV de tampon BC 500 et 10 CV de PBS. L'élution est répétée 8 fois avec 1 CV de tampon 0.1M glycine pH 2.5. L'éluat est immédiatement tamponné avec 1 :10 de CV de Tris pH 8 à 2M. La colonne est neutralisée avec 10CV de tampon Tris pH8 à 1M et rééquilibrée avec du PBS (pH 7 à 7.4). Les anticorps sont dosés par mesure d'absorbance à 540 nm en utilisant le réactif de Bradford d'après les indications du fournisseur (Bio-rad). Les éluats dont l'absorbance est supérieure à 0,1 (environ $>0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sont aliquotés avec 7% de glycérol. Les anticorps ainsi purifiés sont ensuite dilués entre 1/500 et 1/1000 lors des expériences d'immunodétection.

3.3. Immunoprécipitation de protéines par des anticorps immunopurifiés

Les anticorps immunopurifiés et les billes couplées à la protéine A sont mélangés volume à volume (V/V), le volume final est ajusté à 10ml avec du PBS. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 1h sous agitation douce (roue, 5 rpm). L'excédant d'anticorps est retiré en centrifugeant à 100g 5 min et la résine est lavée 2 fois avec 10 CV de tampon 0,2M borate de sodium pH9. Les billes sont resuspendues dans 10 CV de tampon 0,2M borate de sodium pH9 et 20mM de diméthylpimelimidate et incubées 30 min sous agitation douce à température ambiante (5 rpm). La réaction de liaison des Ac à la protéine A est stoppée en lavant les billes avec un tampon à 0,2M d'éthanolamine pH8, pendant 2h à température ambiante sous agitation (5 rpm). La résine est lavée 3 fois avec du PBS 1X, puis 1 fois avec 2

ml de glycine pH 2,5 100mM et de nouveau avec du PBS 1X pour éliminer la glycine. La résine est alors incubée toute la nuit avec les extraits protéiques (10 CV de WCE). Après avoir retiré l'extrait, la résine est lavée 3 fois 5 min avec du BC300 avant l'élution des protéines liées aux anticorps. Les billes sont incubées avec 1 CV de tampon 0,1M glycine pH 2,5 pendant 10 min à 4°. Les billes sont séparées du surnageant par centrifugation de 5 min à 100g. Du bleu de dépôt 4X (40mM TrisHCl pH6.5, 20% glycerol, 0,8%SDS, 0,01% bleu de bromophénol, 5% de β -mercaptoethanol) est ajouté au surnageant. Les extraits sont chauffés et séparés par SDS-PAGE. Les protéines immunoprécipitées et coélues sont détectées par coloration au bleu de Coomassie et western blot.

3.4. Surexpression de protéines recombinantes chez *E.coli*

Les bactéries BL21(DE3) transformées par les constructions en vecteur d'expression bactérien, sont cultivées à 37°C et induites en phase exponentielle de croissance avec 1 mM d'IPTG pendant 3 heures. La culture (500 ml) est centrifugée 15 min à 3000g. Le culot bactérien est lysé dans 10 ml de tampon de lyse (50mM Tris pH 8, 500 mM NaCl, 5% glycerol, inhibeur de protéase (complete tablets, Roche)). Le lysat est homogénéisé à la Presse de French et centrifugé 30 min à 4°C à 21000g. Le surnageant correspond à la fraction protéique soluble et le culot à la fraction protéique insoluble. Le culot est repris dans 10 ml de tampon de dénaturation (50mM Tris pH 8, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 6M urée). La suspension est centrifugée 3 min à 4°C à 21000g. Les fractions solubles et insolubles du lysat bactérien contenant la protéine chimérique taguée (His)₆- sont purifiées sur une colonne d'affinité Ni-NTA (Qiagen). Le protocole détaillé est disponible dans le manuel QIAexpressionist (Qiagen). Brièvement, il s'agit d'équilibrer la résine Ni-NTA avec 2 CV de tampon de lyse (fraction soluble) ou de dénaturation (fraction insoluble) à 5 mM d'Imidazole. L'extrait est incubé en batch avec la résine pendant 1 à 2h. Les protéines non liées spécifiquement à la colonne sont éliminées par 2 CV de tampon de lyse ou de dénaturation à 20 mM Imidazole. La protéine est éluée avec 1 CV de tampon d'élution (tampon de lyse ou tampon de dénaturation à 0.3 M d'Imidazole), cette étape est répétée 2 à 3 fois. Pour TgSET8 purifiée dans la fraction insoluble, les fractions enrichies sont dialysées dans 3L de tampon de dialyse pendant une nuit à 4°C (50mM Tris pH 8, 250 mM KCl, 15% glycerol, 0,5mM DTT, 1mM PMSF). Le produit de dialyse est centrifugé 15 min à 21000g et les extraits protéiques sont conservés à -80°C.

3.5. Essais enzymatiques d'histone méthyltransferase

La réaction enzymatique à lieu dans un volume final de 30µl. Différentes quantités d'extraits protéiques sont incubées avec du tampon HMTase (50mM Tris-HCl pH8,8, 0,5mM DTT, 1mM de PMSF), 1µg de substrat ; 0,1 mM S-Adenosyl-LMethionine pour les essais à froid de TgSET8 et 1µCi 3H-labeled S-adenosyl-L-methionine (82.0 Ci/mmol 1.0mCi/ml) pour les essais radioactifs avec KMTox. Les histones H4 utilisées dans les essais d'histone méthyltransferase sont purifiées à partir d'extraits bactériens exprimant la protéine H4 avec l'étiquette histidine. Les cores histones utilisés dans les essais KMTox sont des cores de poulet (upstate) ou des cores de Toxoplasme purifiés par extraction acide. Le peptide H4 utilisé pour les essais enzymatiques de TgSET8 analysés par spectrométrie de masse est le suivant -AKRHRK₂₀VLR(D) (Eurogentec). La réaction est incubée en bain marie à 30° pendant 60 min. La réaction est stoppée en ajoutant du bleu 4x SDS et les protéines sont séparées par SDS-PAGE (gel gradient 4-12% Bis-Tris NuPAGE, migration en tampon de migration SDS-MES, Invitrogen). Le transfert du groupement méthyle sur les substrats histones est détecté par western-blot pour les essais enzymatiques froids et par exposition du gel séché à un film d'autoradiographie (Kodak) pour les essais radioactifs. L'analyse des produits de réaction enzymatique par spectrométrie de masse a été réalisée en collaboration avec le laboratoire *EDyP* (INSERM-CEA) du Dr Jérôme Garin (voir Protocoles supplémentaires, Sautel et al. 2007).

Les essais enzymatiques HA-FlagKMTox en présence d'H₂O₂ ou de DTT ont consisté à préincuber l'enzyme en solution dans le tampon de réaction enzymatique avec 10µM de H₂O₂ ou 10µM de DTT pendant 30 min à 30°C. Le substrat et le donneur de méthyle radioactif sont ajoutés ensuite et le mélange réactionnel est incubé 1h à 30°C.

3.6. Purification de cores histones de *Toxoplasma gondii*

A partir de 10 T180 de cellules Hela à 80% de confluence infectées par des Toxoplasmes RH. Les parasites extracellulaires sont centrifugés 5 min à 850g, et lavés 2 fois en PBS. Les parasites sont repris dans 5ml de RSB (reticulocyte standard buffer : 10 mM HEPES pH 7,4 ; 10mM KCl ; 1,5mM MgCl₂ ; 0,5mM DTT ; 1,5mM PMSF) à 0,5% de Nonidet P-40 et homogénéisés mécaniquement au *dounce homogenizer*. Après une incubation de 10 min dans la glace, le lysat est centrifugé 10 min à 4°C à 400g. Le culot (correspondant aux noyaux) est repris dans 500µl de MgCl₂ 5mM et un volume égal de HCl 0,8M. Les histones sont extraites

par une incubation de 20 min dans la glace. Une centrifugation de 5 min à 500g à 4°C permet de séparer les débris nucléaires (culot) des histones (surnageant). Les histones sont précipitées par ajout de 10% de TCA. Après 30 min d'incubation dans la glace et le précipitat est centrifugé à 10 min à 8000g. Le culot est lavé deux fois dans 400µl d'acétone froid (par retournement) et centrifugé 5 min à 8000g. Après évaporation de l'acétone, le culot est repris dans 1ml de PBS (roue à 4°C) (Répéter cette étape). Les cores histones (« acid extract ») sont stockés à -80°C.

3.7. Purification de protéines taguées HA-Flag exprimées dans *T.gondii*

Après amplification du clone transgénique stable RH::HAFlag-x, les parasites fraîchement lysés sont collectés par centrifugation à 850 g. Le culot de parasites est repris dans le tampon A (20 % Glycérol, 20mM Tris HCl pH8, 500 mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0,5% NP-40) et broyé mécaniquement avec un *dounce homogenizer*. L'extrait cellulaire est placé sur une roue d'agitation (8 rpm) pendant 30 min à 4°C, puis centrifugé à 21,000 g pendant 30 min. Le surnageant contient les protéines solubles. Cet extrait est incubé pendant 60 min à 4°C en présence de la résine α-Flag, afin d'immunopurifier la protéine d'intérêt taguée Flag. Après un lavage au tampon A, les protéines sont éluées par compétition avec le peptide Flag (500µg/ml). Les fractions collectées sont analysées par séparation sur SDS-PAGE et western blot. Les fractions positives sont enrichies par passage sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille (Superose 6 ou Superdex 200). Les fractions d'intérêt sont précipitées au TCA, séparées par SDS-PAGE et séquencées par spectrométrie de masse MS/MS (Collaboration Dr Jérôme GARIN, EDyP, INSERM-CEA).

3.8. Modélisation 3D de la structure de TgSET8

La modélisation a été réalisée en collaboration avec le Dr. Hassan Belrhali en utilisant le programme Modeler version 8v2 (voir Protocoles supplémentaires, Sautel et al. 2007).

3.9. Immunoprécipitation de la chromatine (Figure 18)

3.9.1. Préparation de la chromatine

Après amplification du clone transgénique stable RH::HAMyc-x, les parasites fraîchement sortis sont collectés. Ils sont fixés pendant 15 min avec 1:10 de tampon de fixation (Formaldehyde 11%, NaCl 0,1M, EDTA 1mM, EGTA 0,5mM, Hépès pH8 50mM). La réaction est stoppée avec 1:20 de glycine 2,5M. Après centrifugation 10 min à 1300g à 4°C, le culot (volume V) est lavé 2 fois au PBS et resuspendu dans 10 V de tampon de lyse (20mM

Tris HCl pH8, 137mM NaCl, 2mM EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 0,5% NP40, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM PMSF). La suspension de lyse est vortexée puis placée 20 min à 4°C sur une roue d'agitation (5 rpm) puis homogénéisée au *dounce homogenizer*. Le lysat parasite est soniqué 10 fois 20 secondes avec des intervalles de 10 secondes. Le produit de sonication est centrifugé 30 min à 21000g à 4°C, le surnageant est aliquoté et un dépôt sur gel d'agarose permet de vérifier l'efficacité de la sonication. Les extraits de chromatine sont conservés à -80°C.

3.9.2. Immunoprécipitation

Pour une IP, 300µl de billes Dynabeads anti-IgG de souris (Invitrogen) sont lavées avec du PBS/BSA 5mg/ml puis les billes (collectées avec le portoir aimanté) sont saturées par incubation en PBS/BSA 5mg/ml, 4h à 4°C sur roue (5 rpm). Les billes sont reprises dans 2 V de PBS/BSA 5mg/ml et 20µl d'Anticorps α-Myc (souris) sont incubés avec les billes pendant 8h à 4°C sur une roue (ou sur la nuit). Le surnageant est retiré, les billes sont lavées au PBS/BSA 5mg/ml pour retirer l'excès d'anticorps. Les billes sont divisées en 3 tubes et incubées avec 1ml de chromatine préparée dans les conditions décrites ci-dessus, à 4°C sur la nuit sous agitation douce (5 rpm). Pour les expériences de qChIP, deux types de ChIP contrôles ont été réalisés :

-une ChIP avec de la chromatine provenant d'une lignée ne possédant pas le tag Myc (RH) afin de mesurer le bruit de fond de la ChIP TgSET8-Myc

-une ChIP avec un anticorps non relevant (HA) afin de déterminer le bruit de fond d'une ChIP réalisée avec les, anticorps dirigés contre différentes modifications d'histone (chromatine RH).

En parallèle des étapes de ChIP, une aliquote de chromatine est conservée à 4°C (Input = ADN total).

Le surnageant, correspondant à l'ADN non lié, est retiré du mélange billes/chromatine puis les billes sont lavées sous agitation douce (roue 5 rpm) à 4°C avec différents tampons:

-lavage de 20 min avec le tampon low salt (0,1% SDS ; 1% triton x100 ; 2 mM EDTA ; 20mM Tris HCl pH8 ; 150mM NaCl).

-lavage de 20 min avec le tampon high salt (0,1% SDS ; 1% triton x100 ; 2 mM EDTA ; 20mM Tris HCl pH8 ; 500 mM NaCl).

-lavage de 20 min avec le tampon LiCl buffer (LiCl 10,6g/L, 1% de NP-40 ; deoxycholate 10g/L ; 1 mM EDTA ; 10 mM Tris HCl pH8).

-2 lavages de 10 min avec le tampon TE1X (10mM Tris HCl pH8, 0.1 mM EDTA pH8).

Le complexe ADN/Ac/prot. est élué avec 250µl de tampon d'éluion (1%SDS, 0,1M NaHCO₃). 1% de SDS et 0,1M de NaHCO₃ sont ajoutés à l'Input. Le mélange d'éluion est vortexé brièvement et incubé 1h sur roue à température ambiante. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et l'éluion est répétée. Les deux fractions d'éluion sont mélangées.

Le cross-link est réversé par ajout de 200mM de NaCl et incubation sur la nuit à 65°C.

Afin d'éliminer la fraction protéique copécipitée, un traitement Protéinase K est réalisé (10µl d'EDTA 0,5M ; 20µl de Tris HCl 1M pH 6,5 ; 2 µl de protéinase K 10mg/ml). La fraction est incubée 1h à 45°C puis l'ADN est extrait par un phénol/chloroforme (V/V). L'ADN est précipité à -20°C pendant 1h suite à l'ajout de 150 µg/ml de tRNA, 300mM d'acétate de sodium, 75% d'éthanol. La chromatine est lavée avec de l'éthanol à 70% et resuspendue dans 50µl d'eau ultrapure.

3.9.3. Identification des gènes cibles d'une enzyme de modification de l'ADN

Ainsi le crosslinking des protéines avec l'ADN, la sonication de la chromatine et l'immunoprécipitation de l'enzyme d'intérêt ont permis de précipiter les régions d'ADN liées à l'enzyme. L'hybridation (par la compagnie Nimblegen) de ces fragments d'ADN sur une puce ADN représentant tout le génome a permis d'identifier les régions cibles des KMT étudiées (Figure 18). Pour l'hybridation sur puce à ADN par la compagnie Nimblegen, les produits de CHIP doivent être amplifiés. Des extrémités linker sont donc ajoutées aux fragments d'ADN pour permettre l'amplification par PCR. Les échantillons sont préparés selon les recommandations de la compagnie (Protocol Nimblegen et Protocoles supplémentaires, Sautel et al. 2007). L'analyse des résultats de CHIP on Chip se fait avec le logiciel *genome browser* développé au cours de ma thèse par les Drs Philippe Ortet et Olivier Bastien. Ce logiciel permet de convertir les données de Nimblegen en graphes de distribution des enzymes d'intérêt sur l'ensemble du génome (Voir Protocoles supplémentaires, Sautel et al. 2007). Les données sont exprimées en log₂ de l'enrichissement c'est-à-dire du ratio ADN immunoprécipité / input.

La détection de fragments connus dans le produit de CHIP peut se faire par Scanning CHIP. Il s'agit de réaliser une PCR classique avec les amorces du gène d'intérêt. Il est important de réaliser une gamme de quantité d'ADN et d'utiliser différents programmes d'amplification

(avec un nombre de cycles plus ou moins élevé) afin de ne pas être saturant et dans le cas échéant, pouvoir détecter des différences de quantité d'ADN immunoprécipitée entre différentes ChIP.

3.10. PCR quantitative en temps réel

Le dosage de la quantité d'ADN immunoprécipité pour chaque ChIP se fait par PCR quantitative en temps réel avec le kit SYBR green (Roche) et un LightCycler 2.0 (Roche). Les mélanges réactionnels sont réalisés d'après les recommandations du fournisseur (Roche). Le choix des amorces est très important pour éviter les problèmes de dimères d'amorces : Tm de 60°C, taille 50-150 pb, GC% 30-60%. Les amorces utilisées sont répertoriées dans la table M1. Différentes quantités d'ADN ainsi que différentes concentrations d'amorces (100-900 nM) ont été testées afin d'optimiser les essais de PCR quantitative en temps réel. Le taux d'enrichissement d'un produit de ChIP est exprimé en % par rapport à l'Input ; c'est-à-dire la quantité d'amplicon issue de l'amplification sur produit de ChIP par rapport à la quantité d'amplicon issue de l'amplification sur l'Input.

Brièvement, le mélange suivant est réalisé à 4°C et conservé à l'obscurité : 9µl d'eau ultrapure, 2µl de primer 3µM, 4µl de réactif master mix. 1µl du produit de ChIP réalisée dans les conditions ci-dessus est dilué avec 4µl d'eau ultrapure. L'ADN et le mélange réactionnel sont mélangés dans les capillaires maintenus à 4°C. Les capillaires sont centrifugés à basse vitesse. Le Light cyclier est paramétré selon les programmes suivants :

➤ Activation 10 min à 95°C

➤ Amplification sur 45 cycles

Température °C	Temps hh :mm :ss	Vitesse de transition de température°(C/s)	Mode d'acquisition
95	00 :00 :10	20	Aucun
55	00 :00 :10	20	Aucun
72	00 :00 :20	20	Unique

➤ Analyse en mode courbe de fusion (« melting curve ») sur 1 cycle :

Température °C	Temps hh :mm :ss	Vitesse de transition de température°(C/s)	Mode d'acquisition
95	00 :00 :00	20	Aucun
40	00 :01 :00	20	Aucun
95	00 :00 :00	0,1	Continu

➤ Refroidissement sur 1 cycle :

Température °C	Temps hh :mm :ss	Vitesse de transition de température°(C/s)	Mode d'acquisition
40	00 :00 :20	20	Aucun

Les courbes d'amplification (« Amplification curve ») permettent de déterminer le Ct de chaque échantillon («cycle threshold»). Le Ct correspond au nombre minimum de cycles nécessaires pour que la fluorescence dépasse le seuil. La « melting curve » permet de vérifier l'absence de formation de dimères d'amorces qui interféreraient sur les mesures de fluorescence. A chaque expérience de PCR quantitative, il est important de réaliser pour chaque paire de primer :

- les échantillons contrôles sans ADN cible afin de mesurer le bruit de fond d'amplification et détecter la formation éventuelle de dimères
- une gamme de différentes quantités d'ADN en contrôle positif afin d'évaluer l'efficacité de l'amplification.

Analyse des résultats d'une expérience en triplicate d'après la méthode de calcul de Frank et al. (Frank et al., 2001) :

1. Calculer la moyenne des Ct de l'input (Ct_{input}).
2. Calculer le ΔCt qui correspond à Ct_{input} - Ct_{ChIP}, c'est à dire la différence entre la quantité d'amplicon issue de l'input et du produit de ChIP.
3. La quantité de produit immunoprécipité par ChIP est exprimée en % par rapport à la quantité d'ADN de l'Input soit :

$$\% \text{ Input} = 2^{-\Delta Ct} \times 2,5 \text{ (Frank et al., 2001; Pfaffl, 2001).}$$

L'immunoprécipitation contrôle réalisée avec l'anticorps α -Myc, sur une lignée ne possédant pas l'étiquette Myc permet de mesurer la quantité de produit de ChIP α -Myc aspécifique. L'immunoprécipitation avec un anticorps non relevant (ici α -HA) permet de mesurer la quantité de produit de ChIP aspécifique sur chromatine RH. Ainsi sur chaque graphe des résultats de QPCR, il est possible de comparer la quantité d'amplicon issue du contrôle négatif et du produit de ChIP spécifique.