

Université Joseph Fourier-GRENOBLE I

THESE

**pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**

**Discipline : Biologie
-Virologie, Microbiologie, Immunologie-**

Présentée et soutenue publiquement par

Céline Sautel

(née le 04.01.1981)

Le 24 octobre 2008

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

Composition du jury :

RUIGROK Rob	Président
SOLDATI-FAVRE Dominique	Rapporteur
LANGSLEY Gordon	Rapporteur
KHOCHBIN Saadi	Examineur
MOUSLI Marc	Examineur
HAKIMI Mohamed-Ali (né le 09.03.1974)	Directeur de Thèse

*Thèse préparée au Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes
CNRS UMR 5163*

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres du jury : **Rob Ruigrok, Dominique Soldati-Favre, Gordon Langsley, Saadi Khochbin, Marc Mousli** qui ont accepté de porter un œil critique sur mes travaux de thèse. Merci plus particulièrement à Dominique Soldati-Favre et Gordon Langsley d'avoir accepté le rôle de rapporteur.

Je souhaite remercier très sincèrement mon directeur de thèse, Mohamed-Ali Hakimi. **Ali**, ton enthousiasme donne de l'élan à chacun de nous. Grâce à toi, j'ai pu réaliser ce travail et j'espère avoir été à la ½ hauteur de tes attentes. J'ai essayé de relever les défis que tu me soumettais. Cela n'a pas toujours été facile, voire possible. Mais quelque fût le résultat cela a toujours été très formateur. Sous ta direction j'ai beaucoup mûri et appris à m'affirmer. Merci, dans les périodes propices, d'avoir pris le temps de m'écouter et d'essayer de me comprendre même si *tu as le vertige alors que j'aime les week-ends en altitude*. Merci de m'avoir donné un aperçu des Etats-Unis.

Je tiens à remercier notre directrice, Marie-France Cesbron-Delauw, de m'avoir accueillie dans son unité. Merci **Marie-France** d'avoir partagé avec moi votre expérience de « *Femme scientifique* ». Pas toujours facile d'accoler ces deux mots. Bravo à vous !

Une autre femme à qui je me suis souvent référée pour rendre ces deux mots « *Femme Scientifique* » harmonieux, **Laurence**. Voisine de paillasse, tu m'as beaucoup accompagnée par nos discussions labo et perso. Je me souviendrai toujours de toi, traversant le labo comme un éclair à 8 mois et demi de grossesse ... Te voir avec cette pêche m'a souvent interdit de dire ou de penser *je suis fatiguée*... Bravo^A, Bravo^I, Bravo^A pour ton énergie et ta persévérance, cela va bientôt payer... Merci d'avoir été plus que le chercheur à mes côtés!

Dominique, je pense que tu es ce que j'aimerais être ! Ta *zenitude* est une arme ! Sous la supervision attentive d'Ali, nous avons collaboré de manière efficace (je pense). Beaucoup des choses que tu as réalisées pour le projet SET8 ne sont pas dans le papier mais je suis le meilleur « reviewer » pour te dire *Beau Boulot* et merci ! Merci pour tes trucs et astuces sur presque toutes les techniques... J'ai eu beaucoup de chance de t'avoir vue rejoindre nos rangs pendant ma thèse, je souhaite à l'équipe que tu les accompagnes longtemps et je te souhaite les plus beaux potagers pour exercer ton art et ta patience.

Alex, que de discussions interminables sur les concours et le parcours pour devenir chercheur. Ca y est, Bravo, tu le méritais bien ! Je te souhaite bon vent au labo, dommage que je n'aie pas bénéficié de plus de réunions labo en ta présence. Ne laisse jamais ta langue dans ta poche ; se sont tes provocations scientifiques qui feront avancer les choses !!! Merci pour ta patience face à mes lacunes en informatique !

Pierre, encore un bel exemple de *zenitude*. J'ai beaucoup apprécié tes interventions toujours très justes et posées lors de nos interactions scientifiques. Merci pour la visite de Paris, ce fût un plaisir de partager ces moments avec toi et Marjo. A toutes occasions tu étais disponible pour m'aider dans la mise au point de protocoles, préparation de dossiers et de présentations ou tout simplement pour discuter de la vie ! Merci et je te souhaite de réussir dans cette carrière qui s'ouvre à toi. Tu méritais bien ce poste aussi.

Olivier, je n'irai pas jusqu'à dire que les théories du transfert latéral de gène, de la divergence, de la perte de gène ou de l'évo-dévo n'ont plus de secrets pour moi ; mais nos discussions m'auront permis de m'initier à ces théories de l'évolution et à la phylogénie. Merci pour tes explications et ton investissement dans nos projets.

Philippe, nous n'avons pas beaucoup eu l'occasion de nous rencontrer, mais merci infiniment pour le développement de *génom browser*, sans lequel beaucoup d'analyses n'auraient pas été possibles.

Hassan, tu m'as permis de voir les prot sur lesquelles j'ai travaillé sous un autre angle. Ces séances d'observation 3D ont été très bénéfiques pour mieux comprendre leurs propriétés enzymatiques. Merci pour ton accueil à l'EMBL et ton investissement dans nos projets.

Sylvie, tu m'as initiée à la spectrométrie de masse en me recevant à l'EDyP, merci pour toutes tes explications et ton investissement dans nos projets.

Karine, OUF... tu as attendu la fin de ma thèse pour décider d'aller visiter une autre région. Ton soutien et ta casquette de gendarme furent essentiels pour maintenir l'organisation qui règne dans le labo. Quel luxe de noter nos besoins en cellules sur ton tableau blanc ! Bravo au labo qui t'a recrutée.

Corinne, merci pour tous tes trucs et astuces et pour tes relectures attentives de certaines de mes productions écrites.

Cordelia, sans tes coups de gueule pour la centri, elle ne tournerait pas si bien, c'est sûr !!! Merci de nous avoir tous si souvent réunis autour de tes clafoutis inimitables...

Amina, tu as rejoins nos rangs après qu'ils aient été désertés par tous les thésards en fin de thèse : **Laetitia, Claire, Cyrille**. Merci à eux d'avoir animé le labo. Bonne continuation à toi, que tes projets se concrétisent.

Evelyne, bien que dans le bloc voisin, tu as fait partie intégrante de mes années au labo. J'ai d'ailleurs commencé sous ton aile en Licence. Puis tu as toujours été là pour me donner des conseils, m'aider à l'organisation des postes particuliers, imposer la rigueur à l'Institut. Bravo et merci ! Enfin sans toi et ta cuisine, les doigts de mariée n'auraient pas apportés cette touche orientale à notre buffet... Merci à toi, Karine et Amina pour votre implication dans leur confection!

Jean, mon parrain de thèse, tu as toujours trouvé un trou dans ton agenda pour me recevoir, merci d'avoir été disponible pour nos discussions sur l'Après Thèse.

Nicole et Michèle, merci pour votre perspicacité dans toutes ces tâches administratives qui ont tendance à nous rebuter... Merci plus particulièrement à Michèle pour les corrections que tu as apportées au manuscrit ! Et bravo de t'être attelée à une telle tâche !

Christiane et Bruno, merci d'avoir toujours bien approvisionné notre magasin de milieux et tampons, encore un luxe auquel je me suis bien habituée !

Néhmé, tu es vite parti pour d'autres horizons dès le début de ma thèse. C'est quand même toi qui m'as initiée à certaines méthodes. J'en retiens : si Néhmé dit « ça prend 5min » et vous donne les explications en fin de journée, il a bien souvent oublié qu'un débutant met toujours plus de temps... Donc prévoir de finir à 21h30 !

Enfin, un grand merci à **mes parents** et mon mari, **Alexis** qui m'ont soutenue pendant ces années Fac et thèse. Désolée d'avoir partagé les moments difficiles avec vous. « *Ah ces gosses, même à 27 ans ils nous causent du souci...* ». Je pense que sans vous trois, cette thèse ne serait pas... Alexis, ma force, merci pour ton soutien quotidien et pour nos échappées en altitude qui m'ont permis de déconnecter quelques heures et le lendemain de reprendre mes manip de plus belle. Tu as été le fermenteur de mon efficacité. Ces remerciements ne peuvent pas être à la hauteur de la reconnaissance que j'éprouve pour vous...

***La vie doit être une lutte continuelle.
Malheur à ceux qui ne combattent pas !
Qui se laissent aller aux choses faciles !***

Frison-Roche, Premier de cordée

A mes parents,

A Alexis,

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 peroxiredoxine</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 methyltransferase.....	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 aiguë 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 aiguë, 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 plasmalemmes 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.cerevisae</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; Dalmaso 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 à 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 chromatiniens : 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 (Caretti 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 méthyler 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 décimère) (Wood et al., 2003b). Nos analyses biochimiques convergent donc vers un modèle d'interaction d'un décimère 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 H_2O_2 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-éluee avec KMTox dans les extraits provenant de parasites soumis à une dose importante de H_2O_2 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 H_2O_2 . 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 $200\mu M$ de H_2O_2 . 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 H_2O_2 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.

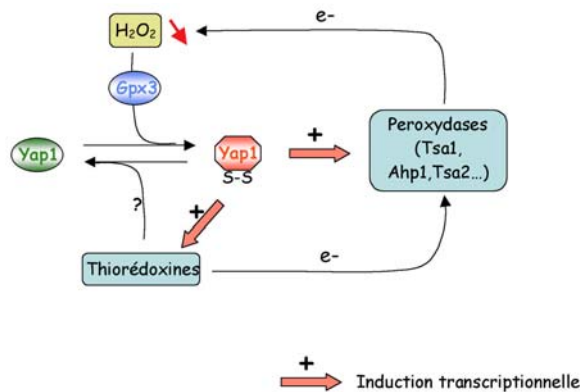
4. Discussion

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 1ms) 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 décamères 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 Plasmodiae 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, corrént 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 méthyler 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	AGACCCGTTTTTGAAGTAGtACATGAAGCT
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	CTGCAGGGAGGAAGACGAAAAGTTG	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 polymérase 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}*(^{B⁻}_r ^{B⁻}_m) *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.

Nom	Protéine	Clones obtenus	Date	Vecteur	Insert	clone utilisé
pCS2	KMTox-HAFlag	1_6; 24-26	12.05.04	pMAH14 (BglII/ClaI)	TgSET13 (BamHI/ClaI)	
pCS7	KMTox	1_4	05.05.04	Topo	TgSET13	clone 2
pCS9	KMTox	6_21	10.01.05	pET28a (BamHI/XhoI)	TgSET13 (BamHI/XhoI)	clone6
pCS25	TgPrx1	12_15	08.02.05	Topo	Prx1 (BamHI/EcoRI) from ADNgénomique	clone15
pCS28	TgPrx1-HAFlag	1;2	15.02.05	pMAH14 (BamHI/EcoRI)	Prx1 (BamHI/EcoRI) from ADNgénomique	clone1
pCS30	TgPrx1	13;14;15	16.02.05	pET28a (BamHI/EcoRI)	Prx1 (BamHI/EcoRI) from ADNgénomique	clone14
pCSxx	TgSET13-HAMyc	11-20	27.06.05	pNS85 BglII-ClaI	pCS7 (BamHI-ClaI)	Clone18
pCS55	TgPrx1-HA-Flag	1_6	24.11.05	pMAH14 (SacI-EcoRI)	Prom Prx + Gène (SacI-EcoRI)	clone 1
pCS56	KMTox	7_12	24.11.06	pCS2 (SacI-BglII)	SET13prom SacI-BamHI	clone
pCS63	TgSet8ΔN1	1_4	20.01.06	topo	SET12 forme AQY (1260pb)	clone4
pCS68	TgSet8ΔN1	1_5	9.02.06	pET28a (BamHI-EcoRI)	SET12 forme AQY (1260pb)	clone 1
pCS72	TgSet8ΔN1	11_18 et 20	8.02.06	topo	SET12 forme AQY oligos BamHI HindIII	clone18
pCS73	TgSet8ΔN1-HAFlag	1_2_4_5	20.02.06	pMAH14 (BamHI/HindIII)	SET12 forme AQY oligos BamHI HindIII	clone 1
pCS80	TgSet8ΔN2	1_4	5.05.06	topo	SET12 mutant1(1000pb)	clone 4
pCS81	TgSet8ΔN3	5_8	5.05.06	topo	SET12 mutant2 (900pb)	clone 8
pCS82	TgSet8ΔN4	9_12	5.05.06	topo	SET12 mutant3 (700pb)	clone 10
pCS86	TgSet8ΔN1(V1875Y)	2.3 3.1	8.06.06	topo	SET12 mutant7 (1000pb)	clone 2.3
pCS87	TgSet8ΔN2	1_6	12.05.06	pET28a (BamHI-HindIII)	SET12 mutant1 (BamHI-HindIII)	clone 2
pCS88	TgSet8ΔN3	1_6	12.05.06	pET28a (BamHI-HindIII)	SET12 mutant2 (BamHI-HindIII)	clone 2
pCS89	TgSet8ΔN4	1_6	12.05.06	pET28a (BamHI-HindIII)	SET12 mutant3 (BamHI-HindIII)	clone 5
pCS102	TgSET8-HAMyc		4.04.06	pNS85 BamHI-HindIII	AQY BamHI-HindIII	clone 5
pCS106	TgSet8ΔN1(F1808Y)	1;2;3;5;7	24.09.06	topo	SET12 Mutant8 (BamHI-HindIII)	clone 7
pCS107	TgSet8ΔN1(F1808Y)	1-3;5;6;8-10	27.09.06	pET28a (BamHI-HindIII)	SET12 Mutant8 (BamHI-HindIII)	clone 2
pCS109	TgSet8ΔN1(F1808Y)		20.10.06	pMAH14 (BamHI-HindIII)	SET12 Mutant8 (BamHI-HindIII) (même insert que pCS107)	

Table M4 : Nomenclature des constructions utilisées pour les travaux présentés dans ce manuscrit.

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 KMTox, 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 Tis-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 parasitaire 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 réalisées :

-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 cycler 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.

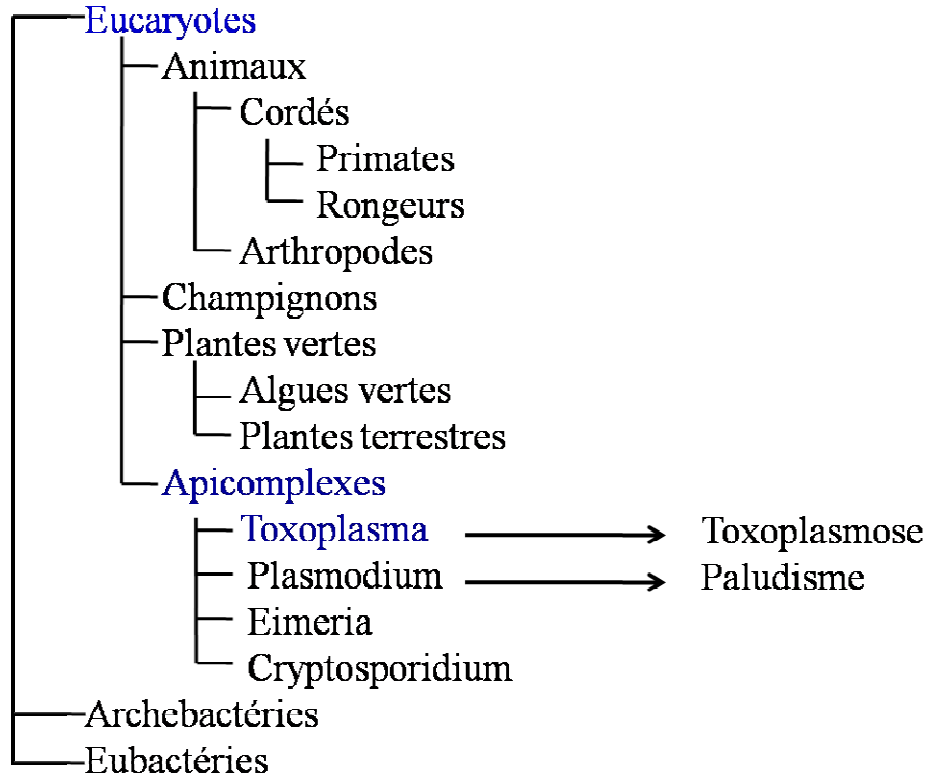
Analyse des résultats d'une expérience en triplicate d'après la méthode de calcul de Frank et al. (Frank et al., 2001) :

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.

a.



b.

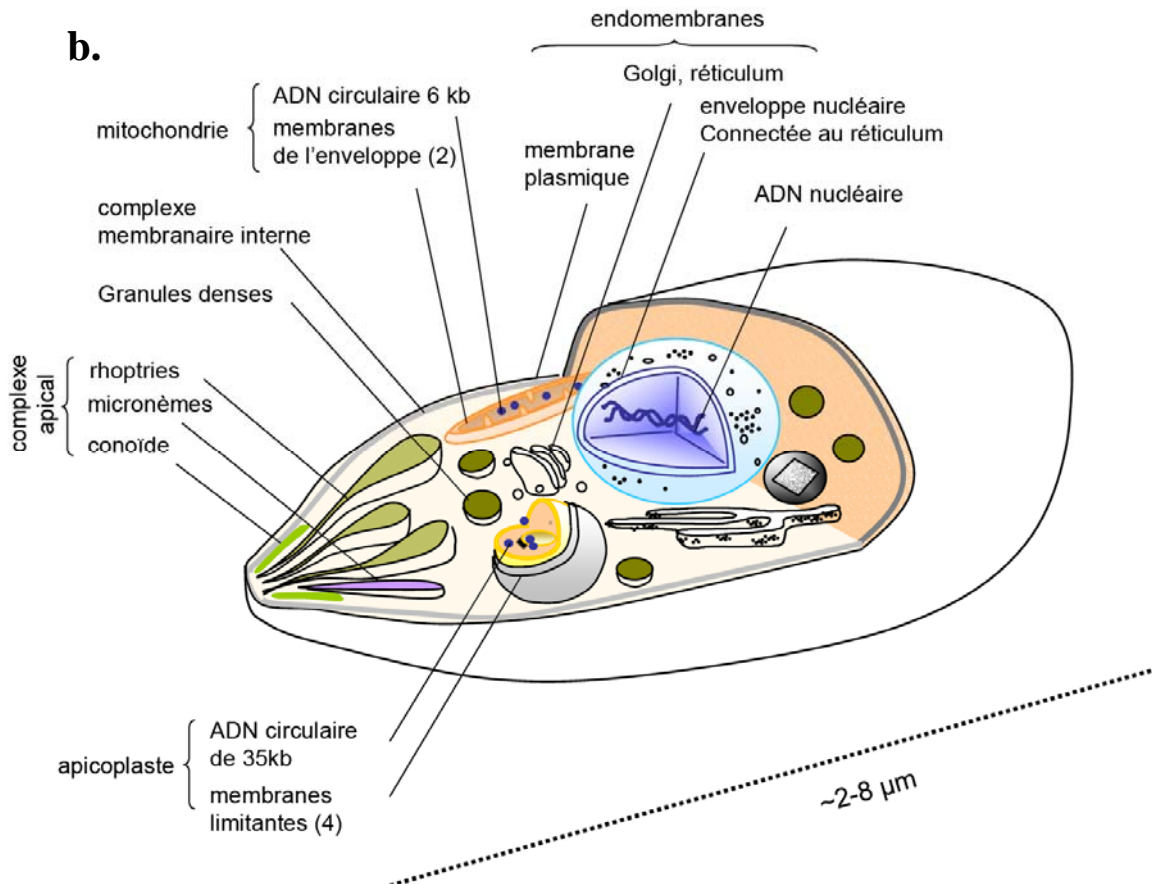


Figure 1 : *Toxoplasma gondii* est un parasite eucaryote du phylum des Apicomplexes.

a. *Toxoplasma gondii* appartient au phylum des Apicomplexes qui regroupe d'autres pathogènes comme *Plasmodium falciparum*, l'agent responsable du Paludisme.

b. Les tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* sont des cellules fortement polarisées. Trois organites sécrétoires vésiculaires participent à l'invasion et à l'élaboration de la vacuole parasitophore : les rhoptries, les micronèmes et les granules denses. Le parasite a acquis un plaste non photosynthétique en plus d'une mitochondrie unique (de <http://www-dsv.cea.fr/pcv/chemogenomique>).

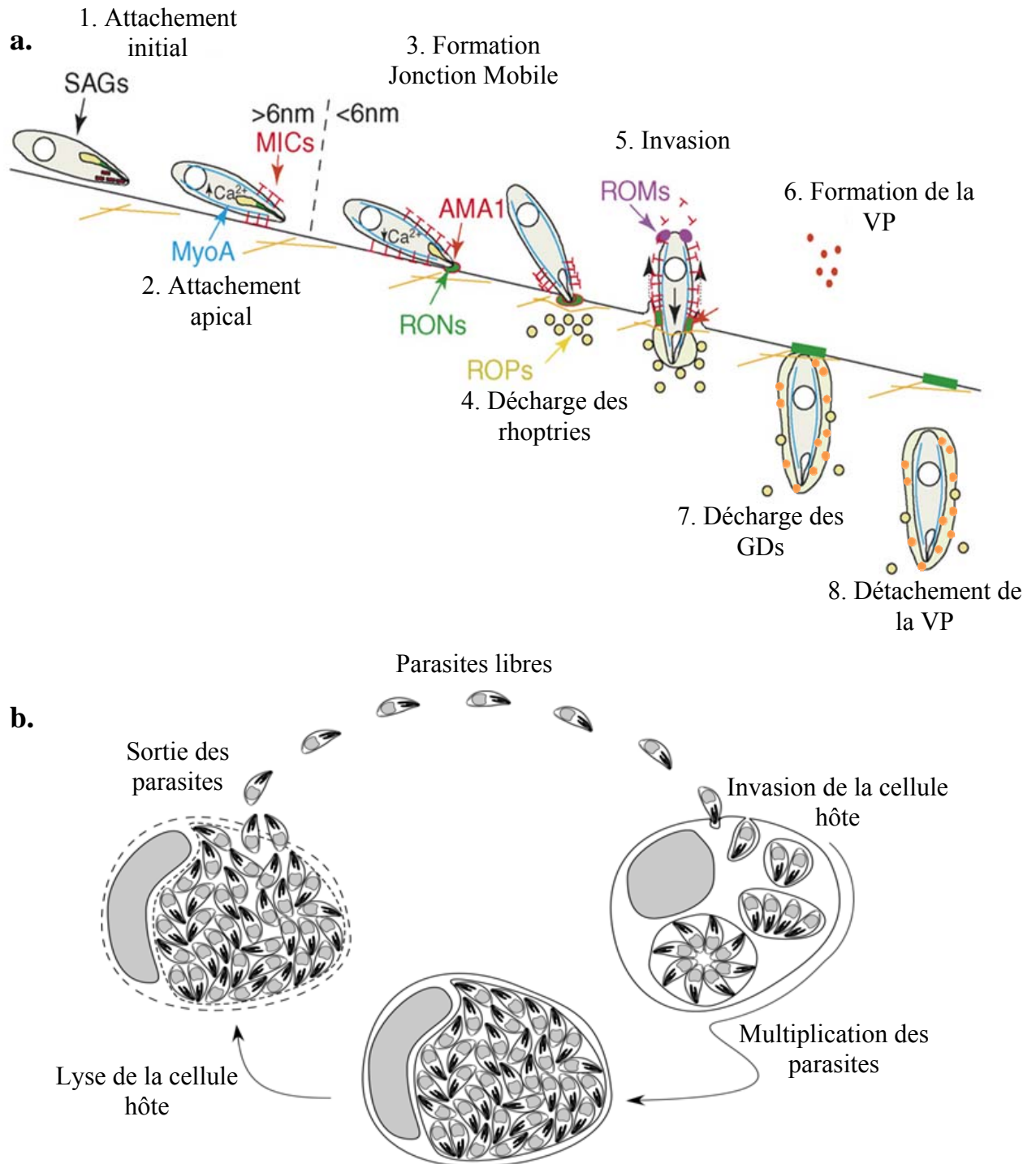


Figure 2 : *Toxoplasma gondii* se multiplie au sein d'une vacuole parasitophore

a. Etapes de l'invasion de la cellule hôte par la forme tachyzoïte.

Mise en évidence des protéines sécrétées, impliquées à chaque étape de l'invasion. (VP : Vacuole Parasitophore, GDs : Granules Denses) (Adapté de Carruthers and Boothroyd, 2007)

b. Cycle lytique de *Toxoplasma gondii*.

Toxoplasma gondii se multiplie par invasion d'une cellule hôte dans laquelle il va proliférer au sein d'une vacuole parasitophore. Après plusieurs cycles de division, il y a lyse de la cellule hôte et les parasites libérés peuvent envahir une nouvelle cellule (Adapté de <http://www2.bc.edu/~gubbelsj/Toxoplasma.html>).

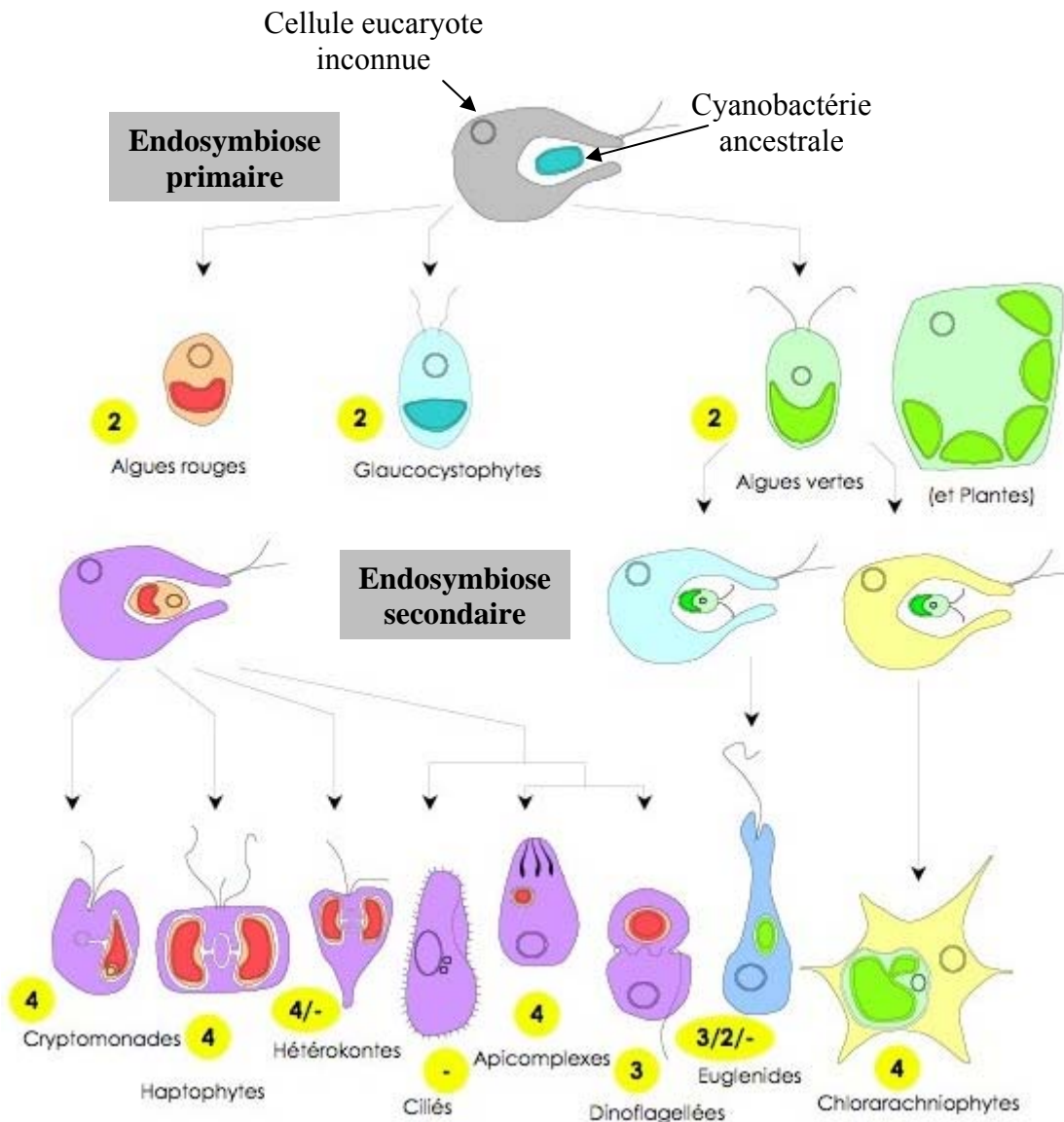


Figure 3 : Évolution de l'ensemble des eucaryotes contenant des plastes.

Une endosymbiose primaire unique entre un eucaryote hétérotrophe ancestral inconnu (en gris) et une cyanobactérie a conduit aux trois lignées primaires porteuses de plastes. Deux autres événements d'endosymbiose secondaire impliquant deux types d'algues vertes différentes et des hôtes non reliés dans l'évolution, ont conduit aux Euglénides (en bleu) et Chlorarachniophytes (en jaune). Une endosymbiose unique entre une algue rouge et un hôte hétérotrophe a conduit à un ensemble d'autres phylums (en violet) (Ciliés, Apicomplexes). La perte de la photosynthèse a eu lieu dans plusieurs taxons de ces groupes. Dans le cas des Ciliés, c'est le phylum entier qui a perdu son plaste. (Adapté de Archibald and Keeling, 2002)

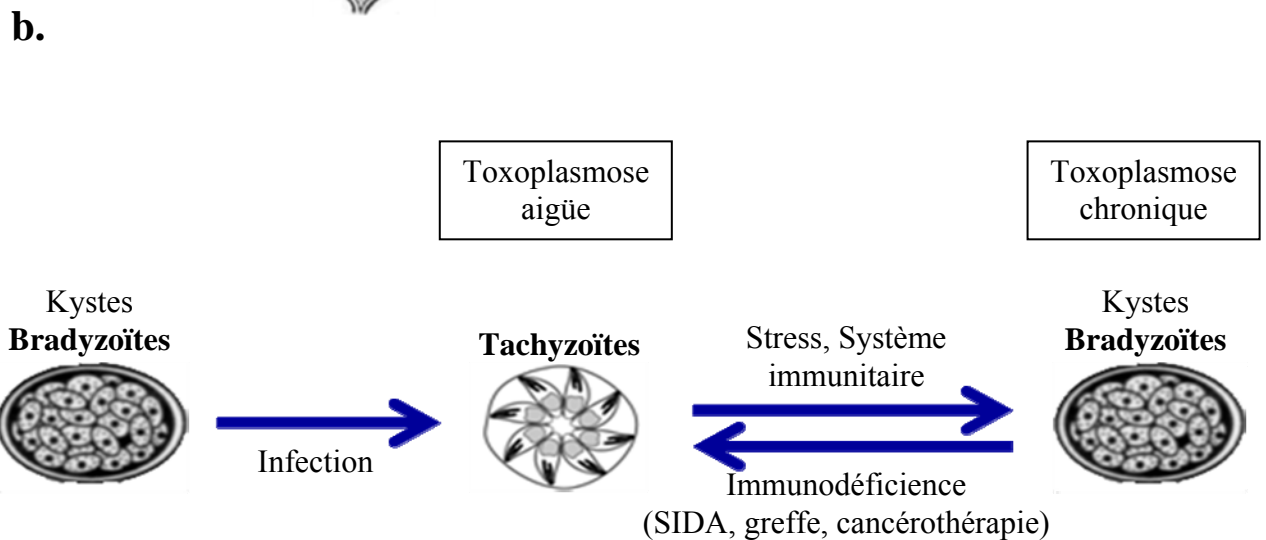
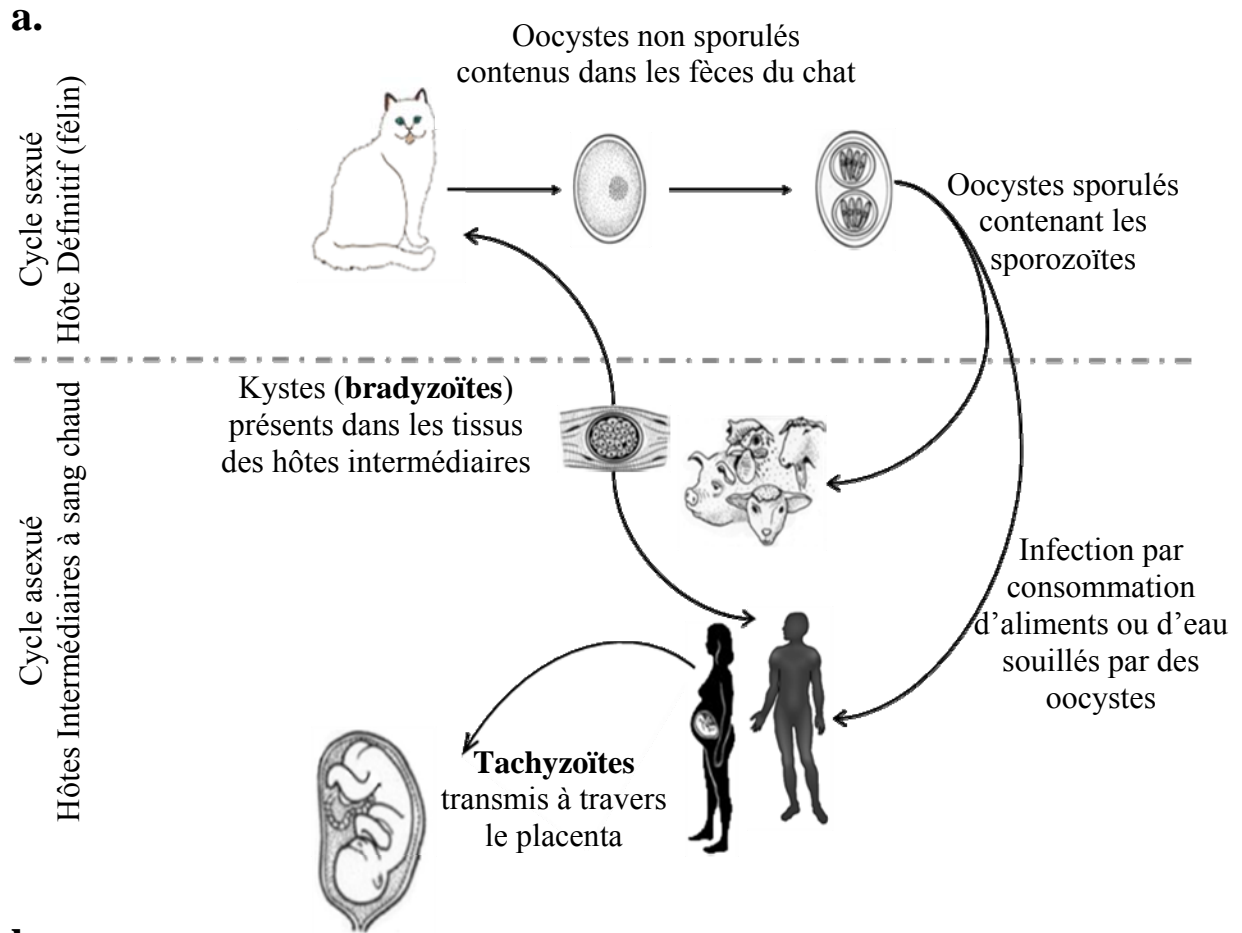
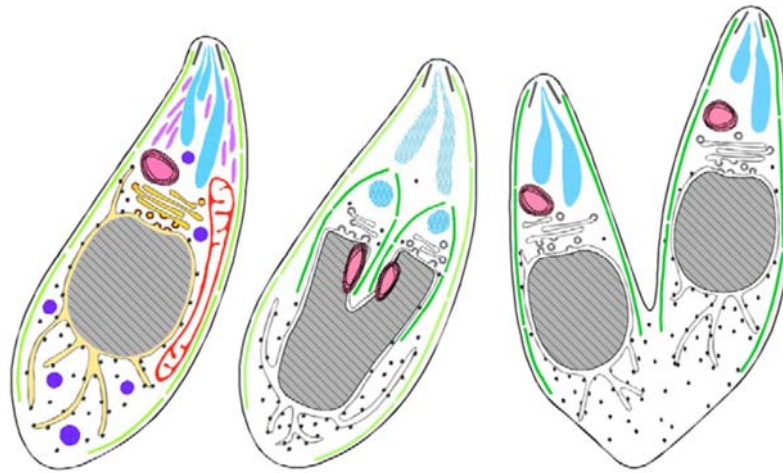


Figure 4 : Cycle biologique du toxoplasme.

a. Le parasite possède un seul hôte définitif (les félins) dans lequel il effectue sa reproduction sexuée par fécondation des gamétocytes. *Toxoplasma gondii* possède de nombreux hôtes intermédiaires homéothermes dans lesquels il effectue sa reproduction asexuée.

b. *Toxoplasma gondii* est doué d'un processus de différenciation réversible entre les formes tachyzoïtes et bradyzoïtes, appelé interconversion.

a.



- | | |
|---------------------------------|---------------------------|
| ■ conoïde, | ■ apicoplaste, |
| ■ complexe membranaire interne, | ■ mitochondrie, |
| ■ rhoptries, | ■ golgi, |
| ■ micronemes, | ■ noyau, |
| ■ granules denses, | ■ reticulum endoplasmique |

b.

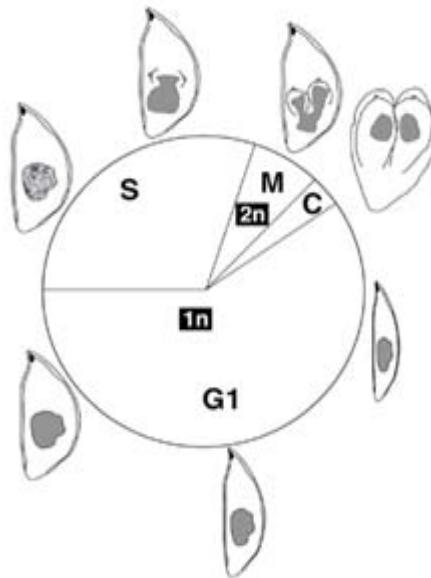


Figure 5 : Division de *Toxoplasma gondii* par endodyogénie

a. Le parasite se divise par endodyogénie. Ce processus permet la formation de deux cellules filles, à l'intérieur de chaque parasite. Ce processus de division se déroule sans perte de la forme de la cellule mère et de la polarité apicale, jusqu'à la scission en deux cellules filles. La forme du noyau en fer à cheval caractérise l'étape de mitose (Adapté Nishi et al., 2008).

b. 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. Les phases G1 et S représentent respectivement ~60 et 30 % d'un cycle de division. La phase G2 est absente ou très courte.

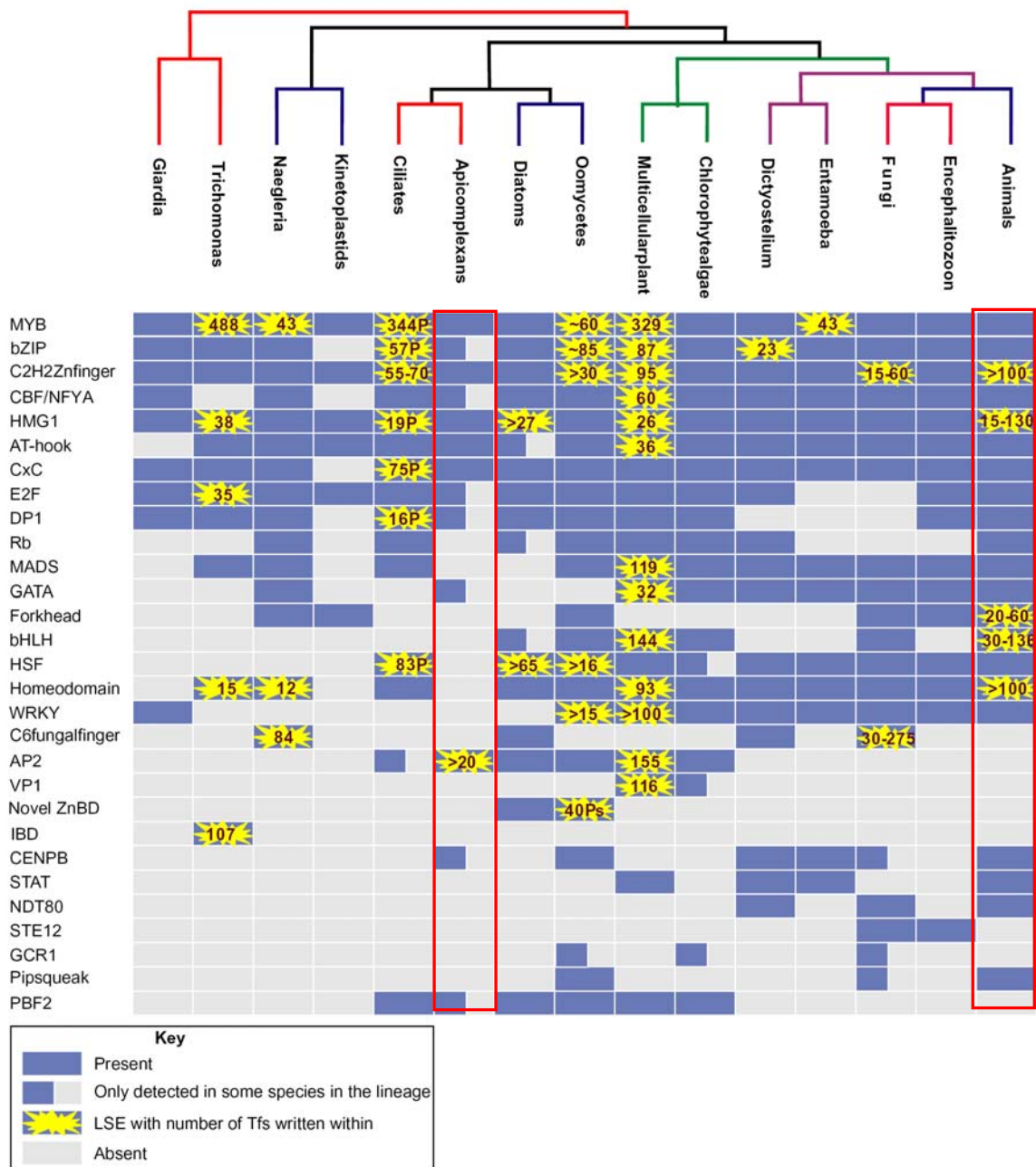
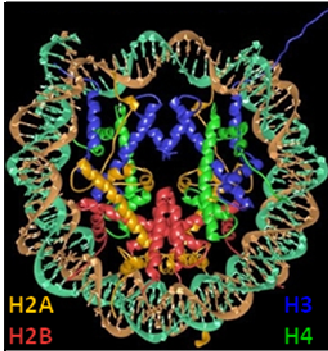
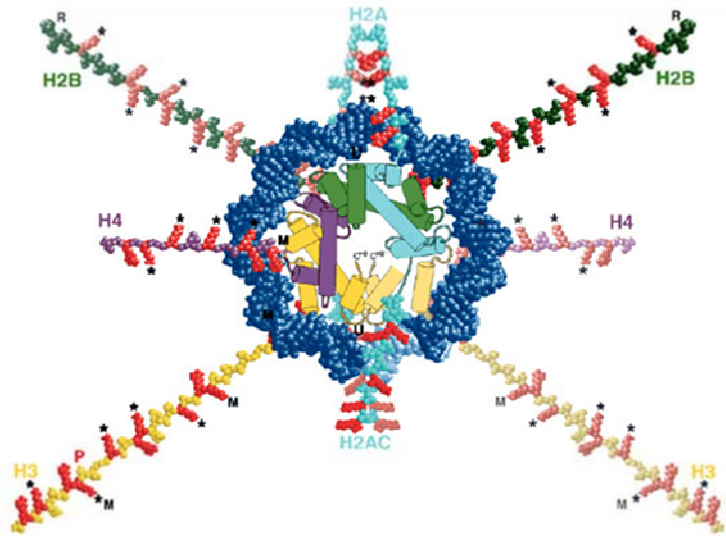


Figure 6 : Evolution des facteurs spécifiques de transcription chez les eucaryotes.
Table tirée de (Iyer et al., 2008)
 (Abréviations : LSE, lineage-specific expansions ; Tfs, specific transcription factors)

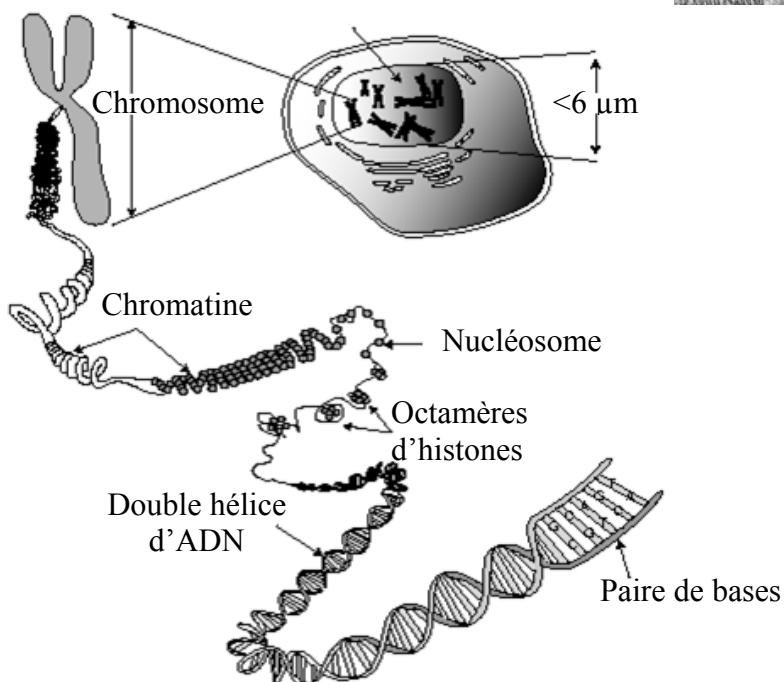
a.



b.



c.



d.

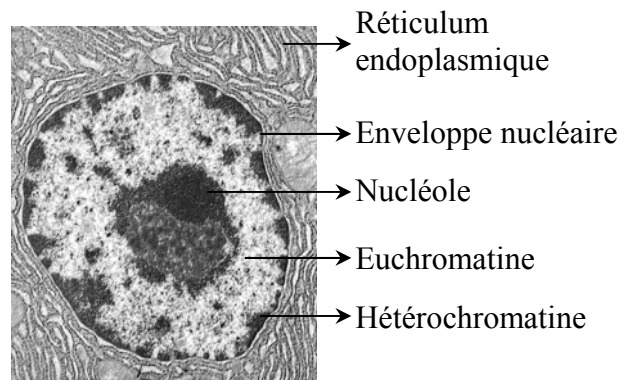


Figure 7 : Structure de la chromatine

a. Structure d'un nucléosome, composé d'un octamère d'histones H2A, H2B, H3, H4, entouré de 146pb d'ADN (Adapté de Luger et al., 1997).

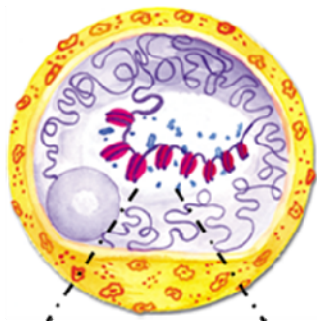
b. Les queues d'histones déstructurées et protubérantes à l'extérieur du nucléosome sont la cible de modifications post-traductionnelles (Wolffe and Hayes, 1999).

c. Les différents niveaux d'organisation de la chromatine.

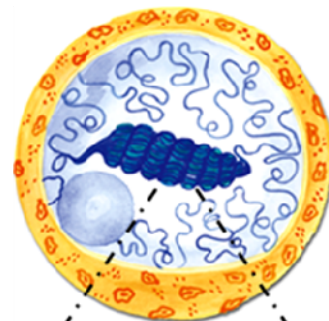
L'octamère d'histones H3, H4, H2A et H2B forme un complexe avec l'ADN, nommé nucléosome, qui est le premier niveau de compaction. L'histone H1 aide à la compaction du deuxième niveau qui est appelée fibre de 30 nm. Cette fibre peut alors former des boucles de 300nm qui, sous forme extrêmement condensée, vont former le chromosome.

d. Image en microscopie électronique du noyau d'une cellule eucaryote.

L'hétérochromatine correspond aux zones sombres, alors que l'euchromatine, moins dense, correspond aux zones claires. Le nucléole est le siège de la synthèse des ARN ribosomiaux. (<http://academics.hamilton.edu/biology/kbart/image/nucleus.jpg>)



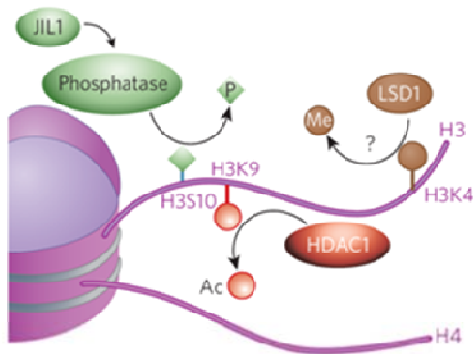
Euchromatine



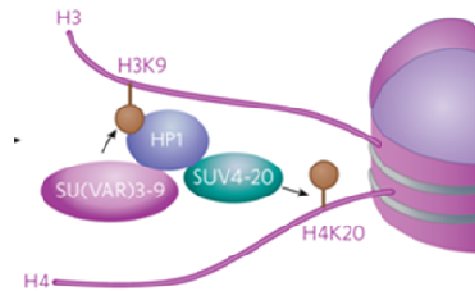
Hétérochromatine

- ✓ Décondensée
- ✓ Localisée sur les bras des chromosomes
- ✓ Contient des séquences uniques
- ✓ Riche en gènes
- ✓ Répliquée pendant la phase S
- ✓ Recombinaison méiotique

- ✓ Fortement condensée
- ✓ Localisée sur les centromères et les télomères
- ✓ Contient des séquences répétées
- ✓ Pauvre en gènes
- ✓ Répliquée en fin de phase S
- ✓ Pas de recombinaison méiotique



b.



c.

		Euchromatine			Hétérochromatine		
		<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Humain	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Humain
	Acétylation	Hyperacétylée Hypoacétylée			Hypoacétylée		
Méthylation	H3K4	X	X	X			
	H3K9		X	X		X	X
	H3K27			X			
	H3K36	X X		X X			
	H3K79	X		X			
	H4K20			X		Rep. ADN	X

- Transcription réprimée
- Transcription activée

Figure 8 : Euchromatine vs hétérochromatine.

a. Propriétés biologiques et génétiques des chromatines (Adapté de Grewal and Elgin, 2007).

b. Cartographie des enzymes et des marques impliquées dans la transition entre les deux états chromatiniens chez la Drosophile. Les gènes actifs de l'euchromatine présentent les modifications H3K4-me3 et H3K9-ac. La déméthylation de H3K4-me3 met en jeu une déméthylase (probablement LSD1), tandis que la déacétylation de H3K9-ac implique une HDAC. A ce stade, l'euchromatine est inactive. La répression passe ensuite par une étape de méthylation de H3K9. La déphosphorylation de H3S10 par une phosphatase (recrutée via le C-terminal de la kinase JIL1), favorise la méthylation de H3K9. Cette dernière modification est catalysée par SU(VAR)3-9 et conduit à la liaison de HP1. Cette protéine permet le recrutement de SUV4-20, l'enzyme responsable de la méthylation de H4K20. Dans cet état de modification, la chromatine est réprimée (Adapté de Grewal and Elgin, 2007).

c. Tableau de quelques modifications épigénétiques caractéristiques des régions euchromatiques et hétérochromatiques chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* et chez l'Homme. Chez *S. pombe* la méthylation de H4K20 est présente mais n'est pas impliquée dans la formation d'hétérochromatine, elle intervient dans le processus de réparation de l'ADN (Rep. ADN).

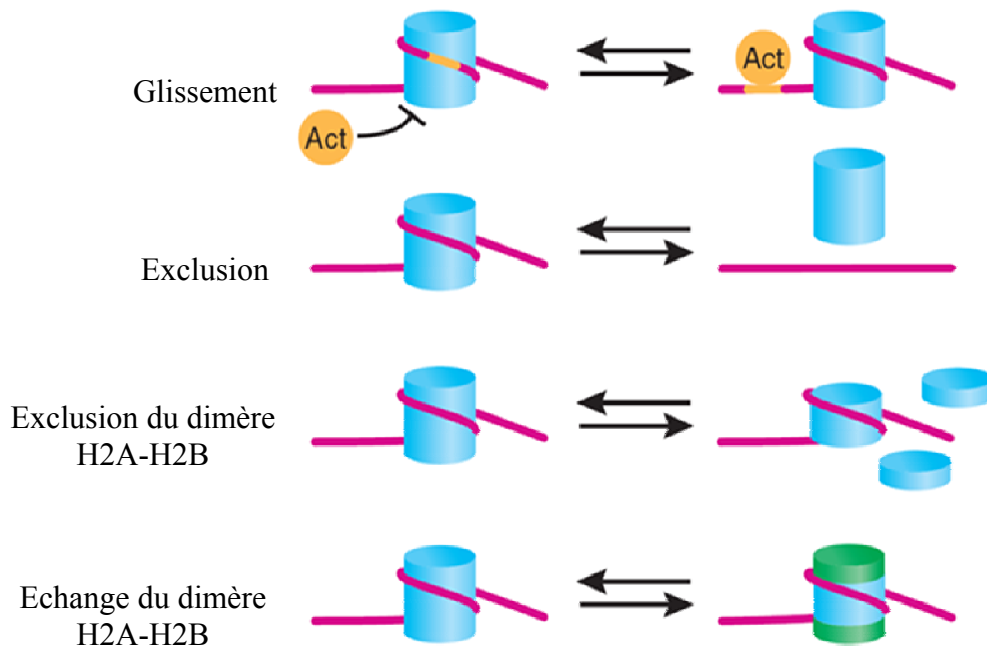
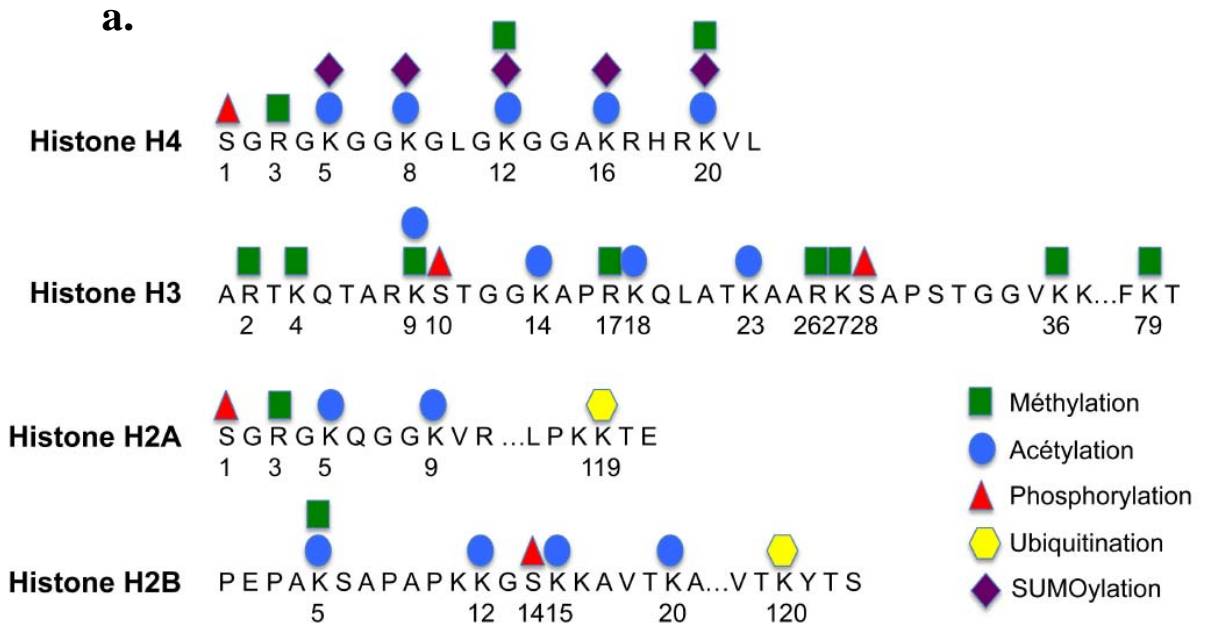


Figure 9 : Modèles de remodelage des nucléosomes.

Des facteurs de remodelage ATP-dépendants, permettent à différents facteurs d'accéder à l'ADN en faisant glisser les nucléosomes ou en les éjectant de la chromatine. Ces facteurs de remodelage physique de la chromatine peuvent également procéder à l'échange des histones canoniques par des variants d'histones (Abréviation : Act, Activateur) (Adapté de Cairns, 2007).



b.

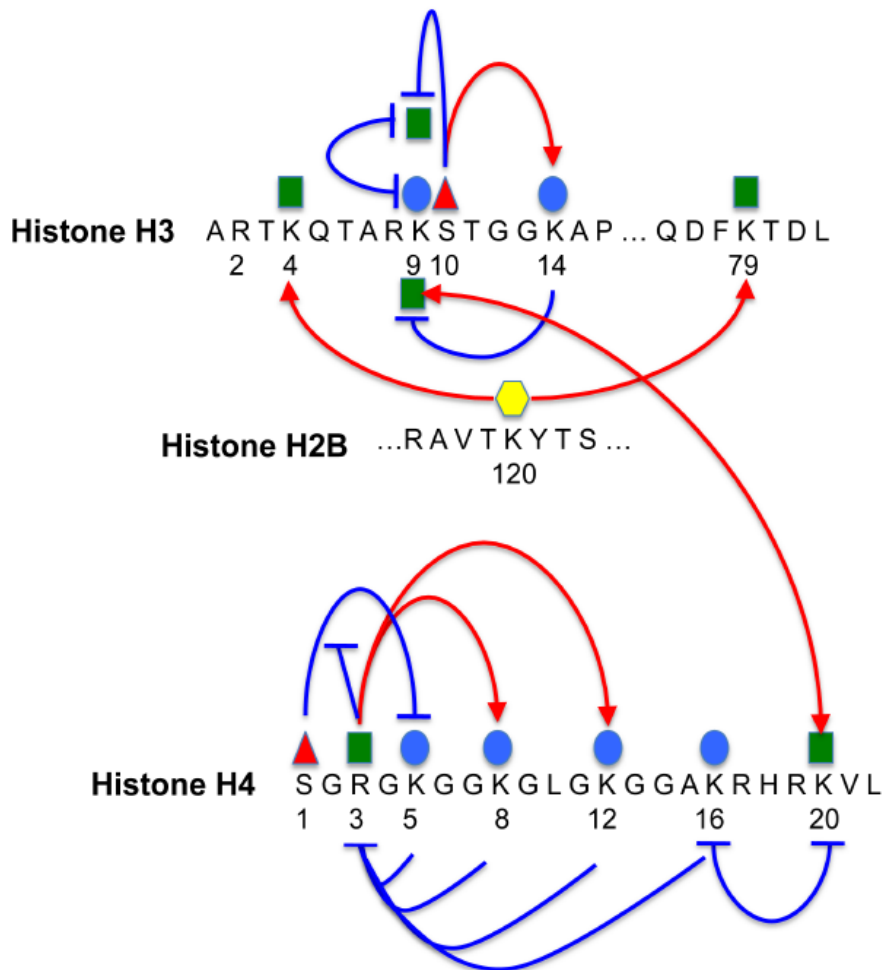
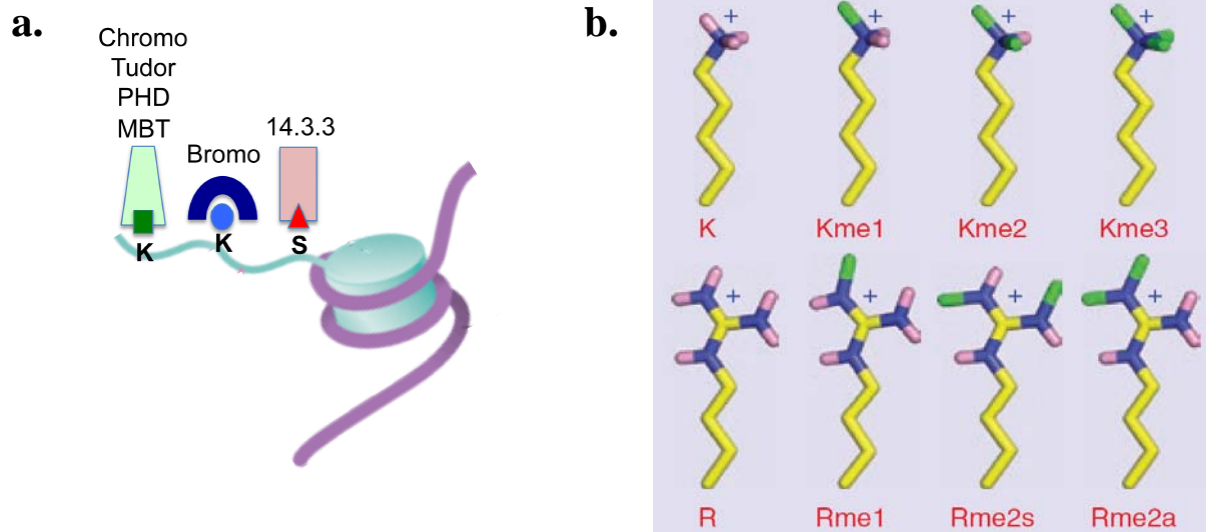


Figure 10 : Le code histone

a. Séquences primaires des queues N-terminales des histones H2A, H2B, H3 et H4 avec les modifications chimiques post-traductionnelles caractérisées à ce jour.

b. Une modification d'histone peut en influencer une autre de manière synergique (en rouge) ou antagoniste (en bleu). Exemples d'inter-relations entre les marques, qui ont permis d'émettre l'hypothèse du « code histone ». La phosphorylation de H3S10 autorise l'acétylation de H3K14. Ces deux modifications répriment alors la méthylation de H3K9. Cette modification empêche quant à elle l'acétylation du même résidu H3K9 et inversement. Chez l'homme, la monoubiquitination de H2BK120 est nécessaire pour la méthylation de H3K4 et H3K79. La méthylation de H4R3 autorise l'acétylation de H4K8 et H4K12. Par contre, l'acétylation de H4K5, H4K8, H4K12 et H4K16 inhibe la méthylation de H4R3. La phosphorylation de H4S1 inhibe l'acétylation de H4K5, cette inhibition est bloquée par la méthylation de H4R3. L'acétylation de H4K16 et la méthylation de H4K20 s'inhibent réciproquement.



c.

Domaines de lecture	Modifications post-traductionnelles
Bromodomaine	Plusieurs histones Kac,
Chromodomaine	H3K9me2/3, H3K27me2/3
Double chromodomaine	H3K4me1/2/3
Chromo barrel	H3K36me2/3
Tudor	Rme2s
Double/tandem tudor	H3K4me3, H4K20me3
MBT	H4K20me1/2, H4K20me1/2, H1K26me1/2 H3K4me1, H3K9me1/2
PHD finger	H3K4me3, H3K4me0 H3K9me3, H3K36me3
WD40 repeat	H3R2/K4me2, R, Sph, Tph
14-3-3	H3S10ph, H3S28ph, Sph, Tph
BRCT	H2AX-S139ph, Sph, Tph

Figure 11 : Le code histone et sa lecture.

a. Schéma de la liaison des domaines spécifiques à un résidu modifié.

Les résidus méthylés, acétylés ou phosphorylés des histones servent de plate-forme à différents domaines structuraux portés par des protéines impliquées dans la transduction du « code histone » en message biologique.

b. Les différents états de méthylation des résidus lysine et arginine.

Les lysines (K) peuvent être mono-, di-, ou triméthylées alors que les arginines (R) sont soit mono- soit diméthylées. Dans ce cas, la diméthylation des arginines peut être symétrique (s) ou asymétrique (a) (Adapté de Taverna et al., 2007).

c. Domaines de lecture des modifications.

(Adapté de Taverna et al., 2007)

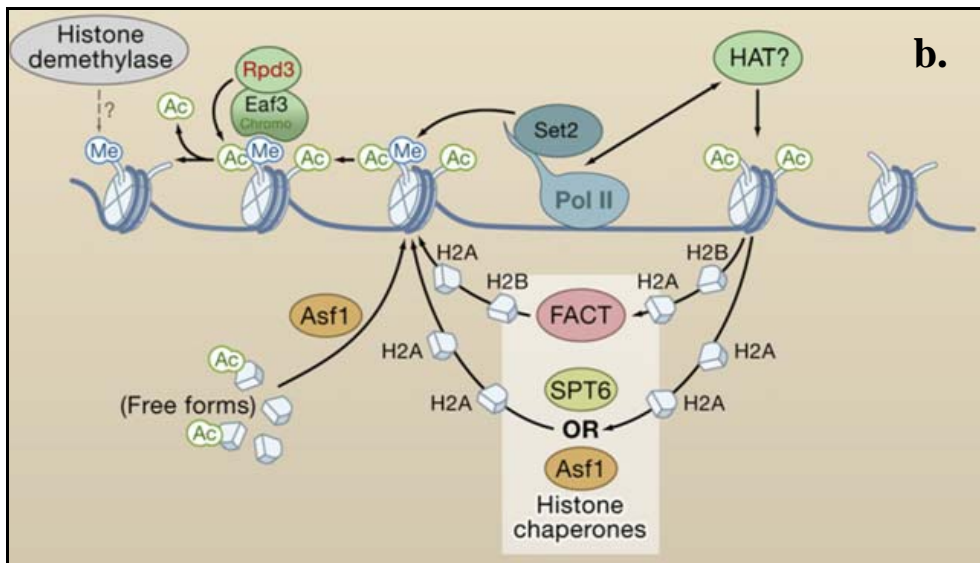
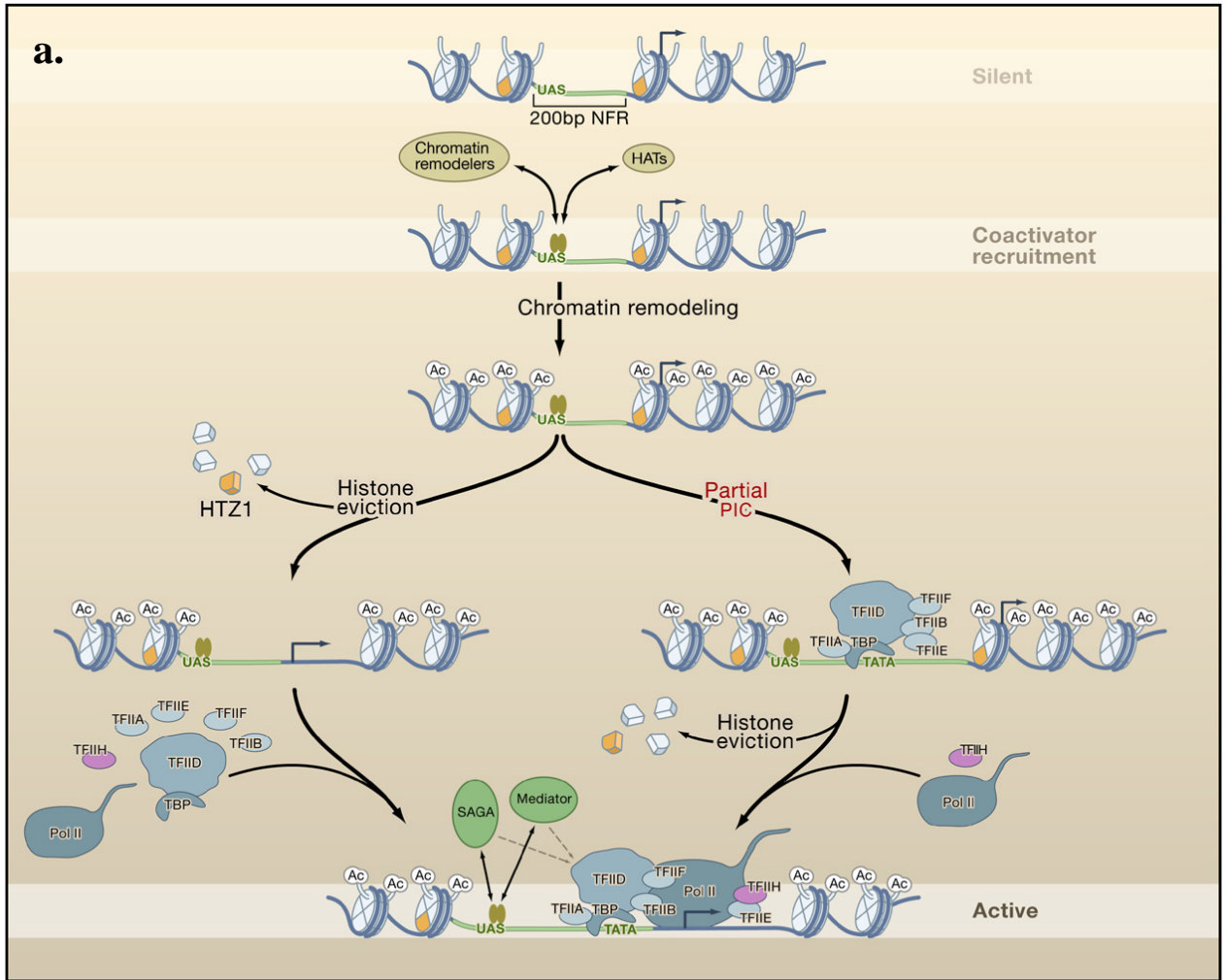


Figure 12 : Régulation de la structure chromatinienne au cours de la transcription.

a. Remodelage de la structure chromatinienne accompagnant l'initiation de la transcription.

Le recrutement de coactivateurs de la machinerie de transcription, incluant des remodeleurs physiques (Swi/Snf) et chimiques (HATs) de la chromatine et l'exclusion des variants Htz1 va rendre la région promotrice permissive au recrutement du complexe de préinitiation de la transcription (PIC). Le PIC est constitué des facteurs généraux de transcription (TBP-TFIID, TFIIF, TFIIA, TFIIE, TFIIH, TFIIB) associés à la PolIII. L'interaction avec les facteurs SAGA et mediator favorise la formation du PIC. Il existe un second modèle impliquant les mêmes facteurs mais dans une chronologie différente (droite) (Li et al., 2007).

b. Remodelage de la structure chromatinienne accompagnant l'élongation de la transcription.

L'élongation de la transcription implique des HATs pour acétyler les nucléosomes que la machinerie d'élongation rencontre. Il y a également recrutement de chaperones d'histones en charge de la réincorporation des histones exclues au passage de la PolIII (FACT, SPT6, Asf1) ou de l'incorporation de nouvelles histones (Asf1). Les nucléosomes réincorporés sont immédiatement méthylés par Set2. La méthylation de H3K36 par Set2 est reconnue par une enzyme à chromodomaine (Eaf3) qui recrute un complexe à activité déacétylase (Rpd3) (Li et al., 2007).

**Histones acétyltransférases
(HATs)**

- GCN5-A, -B (AA29981, AAW72884)
- Myst-A, -B (AAT81527, AAZ79483)
- Elp3 (541.m01178)
- Hat1 (83.m02144)
- TAF1/250 (64.m00349)

**Histones déacétylases
(HDACs)**

- HDAC1-5 (74.m00425, 50.m03318, AAY53803, 55.m04722, 20.m03703)
- Sirtuine (Sir2 42.m00081, SirT6 57.m01849)

**Histones arginines méthyltransférase
(PRMTs)**

- PRMT165 (AAX19953, 83.m01208, 52.m01547, AAX19952, 33.m01376)

**Histones lysines méthyltransférases
(KMTs)**

- SET1-19 (ex : 42.m03532)

Lysine déméthylase

- LSD1, 2 (63.m00151, 49.m03290)
- JmjC (542.m00225, 76.m01561, 42.m05839, 55.m04927)

Histone Kinases

- Snf1-1A, -B (44.m02822, 80.m02306)
- PP1 histone phosphatase (583.m05380)

ADP-ribosylation

- Protéines à domaine PARP et PARG (ex : 59.m03538, 55.m05011)

Ubiquitination/Sumoylation

- Ubiquitine ligase (ex : 35.m00006)
- Ubc9 enzyme conjugante de la sumoylation (25.m01826)

SWI2/SNF2 ATPases

- 2 Snf2/ Brahma (Bromodomaine) 641.m01573, 65.m01174)
- 2 ISWI (SANT ou AT hook domaine) (59.m00063, 645.m00313)
- 1 Mi2 (chromodomaine) (55.m04750)
- 1 SRCAP/Ino80 (AAL29689)
- 10 autres protéines à domaine SNF_2

Figure 13 : Les enzymes de remodelage physique et chimique de la chromatine chez *Toxoplasma gondii*.

Les numéros d'accès à GenBank ou ToxoDB sont indiqués entre parenthèses (Adapté de Sullivan and Hakimi, 2006)

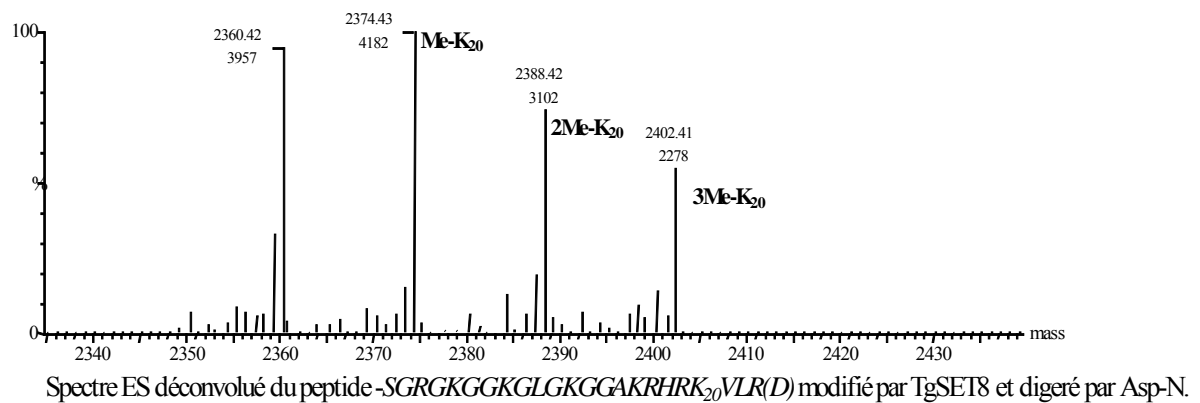
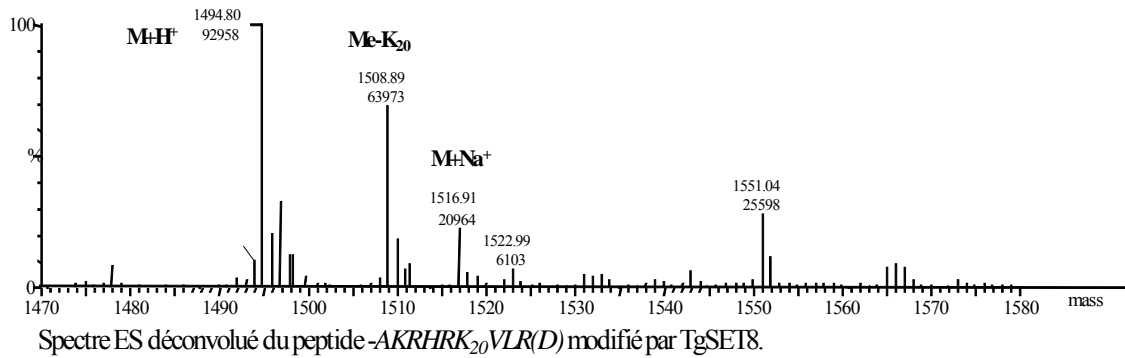


Figure 14 : Spécificité de l'activité de TgSet8 déterminée par spectrométrie de masse.

a. Spectre déconvolué du peptide -AKRHRK₂₀VLR (D) modifié par TgSET8

b. Spectre déconvolué de l'histone H4 -SGRGKGGKGLGKGGAKRHRK₂₀VLR (D) modifiée par TgSET8, après digestion par AspN. Les masses moléculaires du peptide non méthylé, mono-, di- et triméthylé sont marquées au-dessus des pics (Collaboration Jérôme Garin, laboratoire EdYP).

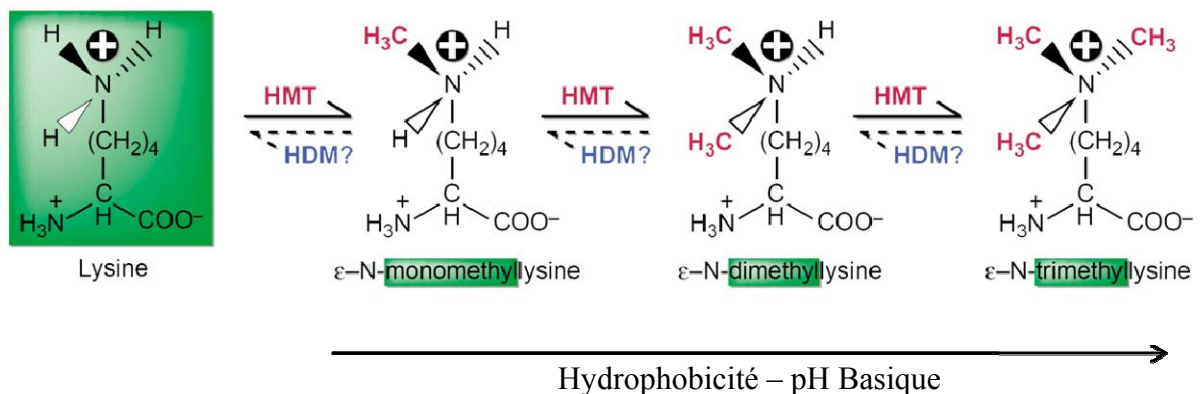
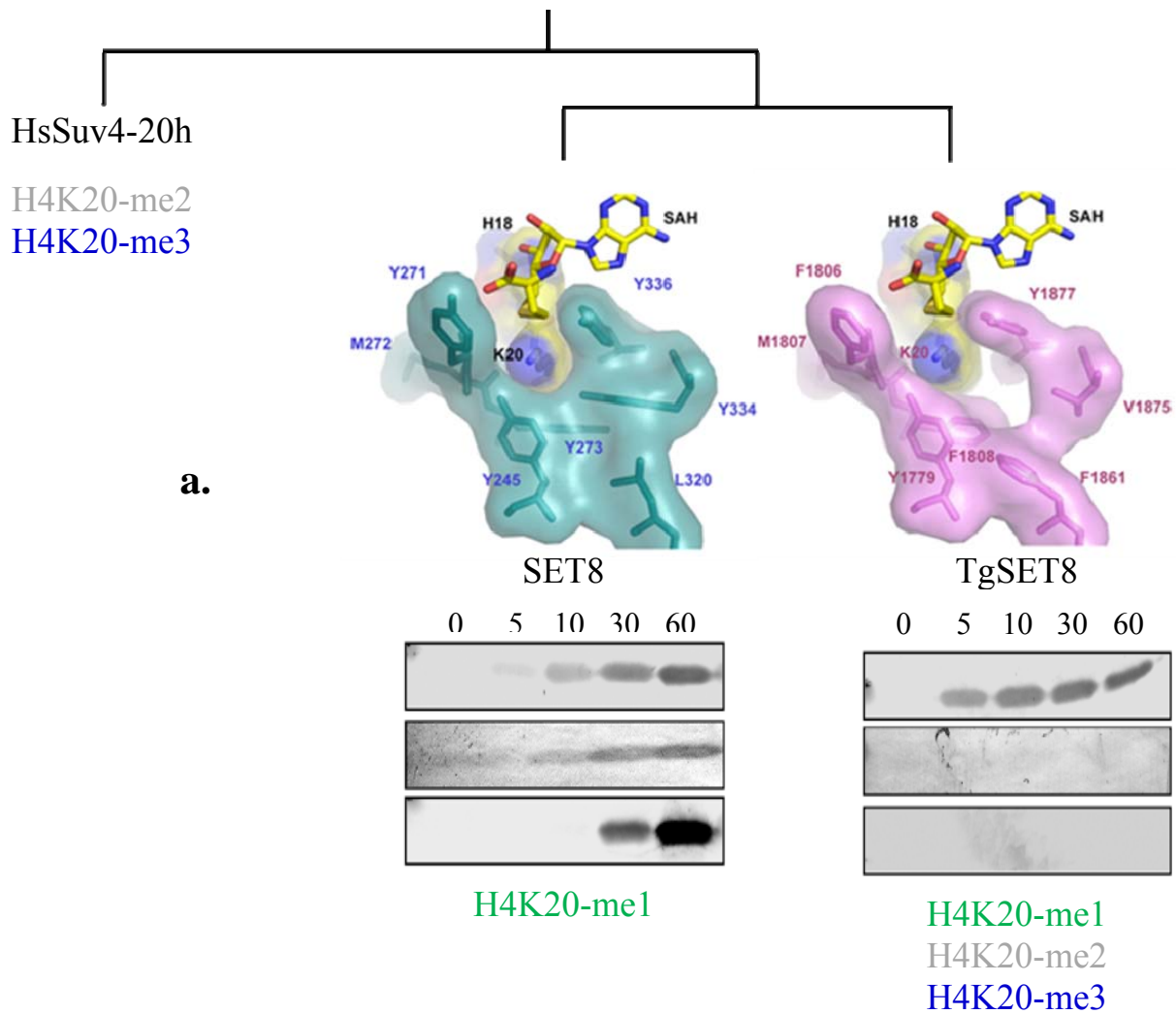


Figure 15 : Réaction de méthylation d'un résidu lysine.

L'attaque nucléophile du donneur de méthyle nécessite la déprotonation du résidu receveur. Une hydrophobicité et un pH élevé (basique) sont favorables à plusieurs étapes de méthylation (Adapté de Rice and Allis, 2001).



b.

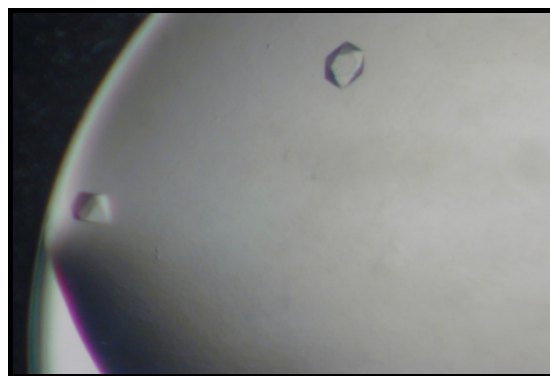


Figure 16 : Comparaison des propriétés enzymatiques et structurales de SET8 de *Toxoplasma gondii* et de l'Humain.

a. L'humain mobilise deux enzymes, HsSUV4-20h et HsSET8 pour catalyser respectivement les modifications di-/tri-méthyle et mono-méthyle de H4K20 alors que *Toxoplasma gondii* possède une enzyme capable d'ajouter consécutivement les trois groupements méthyles.

b. Cristaux de TgSET8 en cours d'analyse (image des Drs Hassan Belrhali et Maria Jesus Mate Perez).

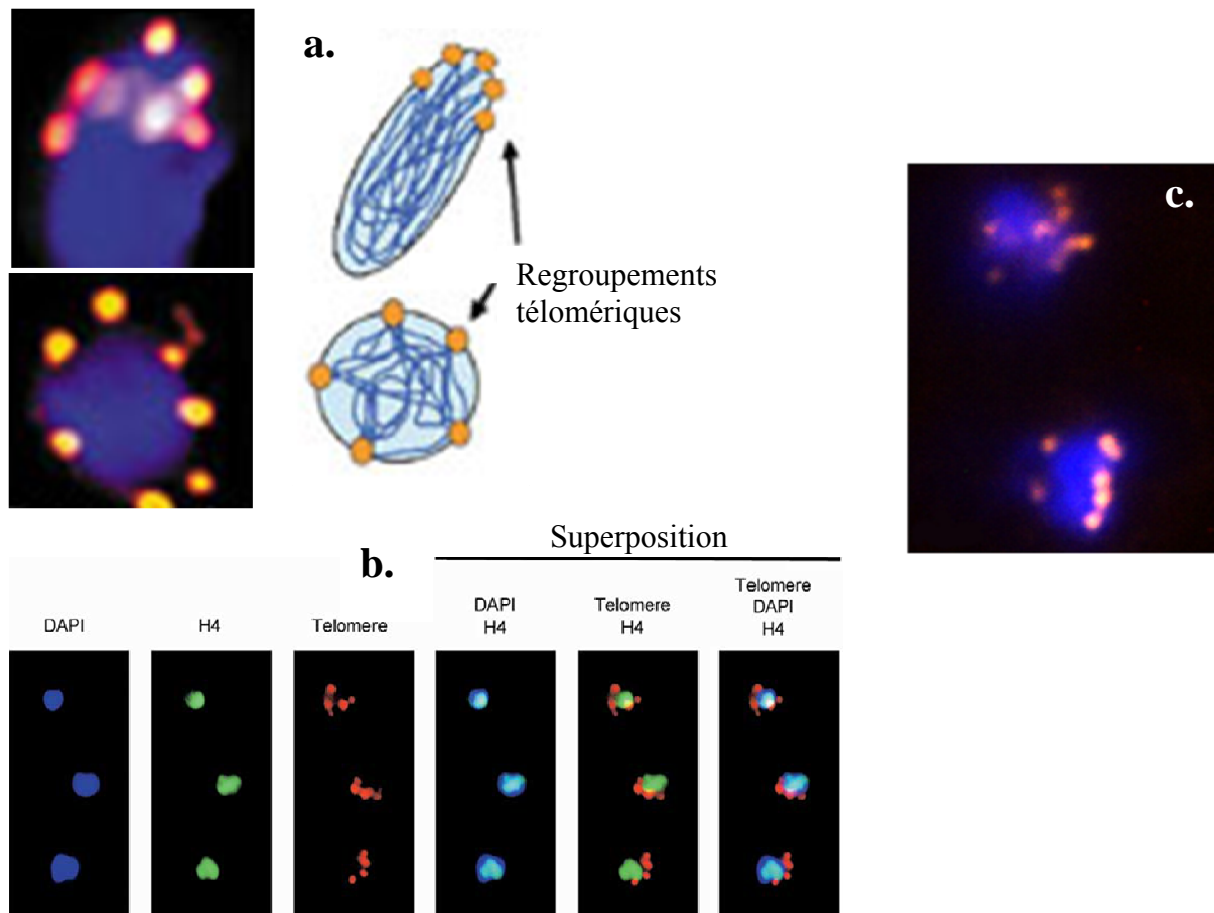


Figure 17 : Structure et organisation des télomères de *Plasmodium falciparum*.

a. Architecture télomérique des chromosomes de *Plasmodium falciparum*.

(Issu de : <http://www.cnrs.fr/Cnrspresse/n390/html/n390a09.htm>, Arthur Scherf)

b. Mise en évidence des histones acétylées (vert), des télomères (rouge) et de l'ADN (bleu) de jeunes trophozoïtes. Les histones acétylées sont exclues de la périphérie du noyau (Image issue de Freitas-Junior et al., 2005)

c. L'analyse de l'organisation du noyau de *Plasmodium falciparum* a montré que les télomères sont localisés à la périphérie du noyau et sont physiquement regroupés. (<http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR2003/Bihp.html>, Arthur Scherf)

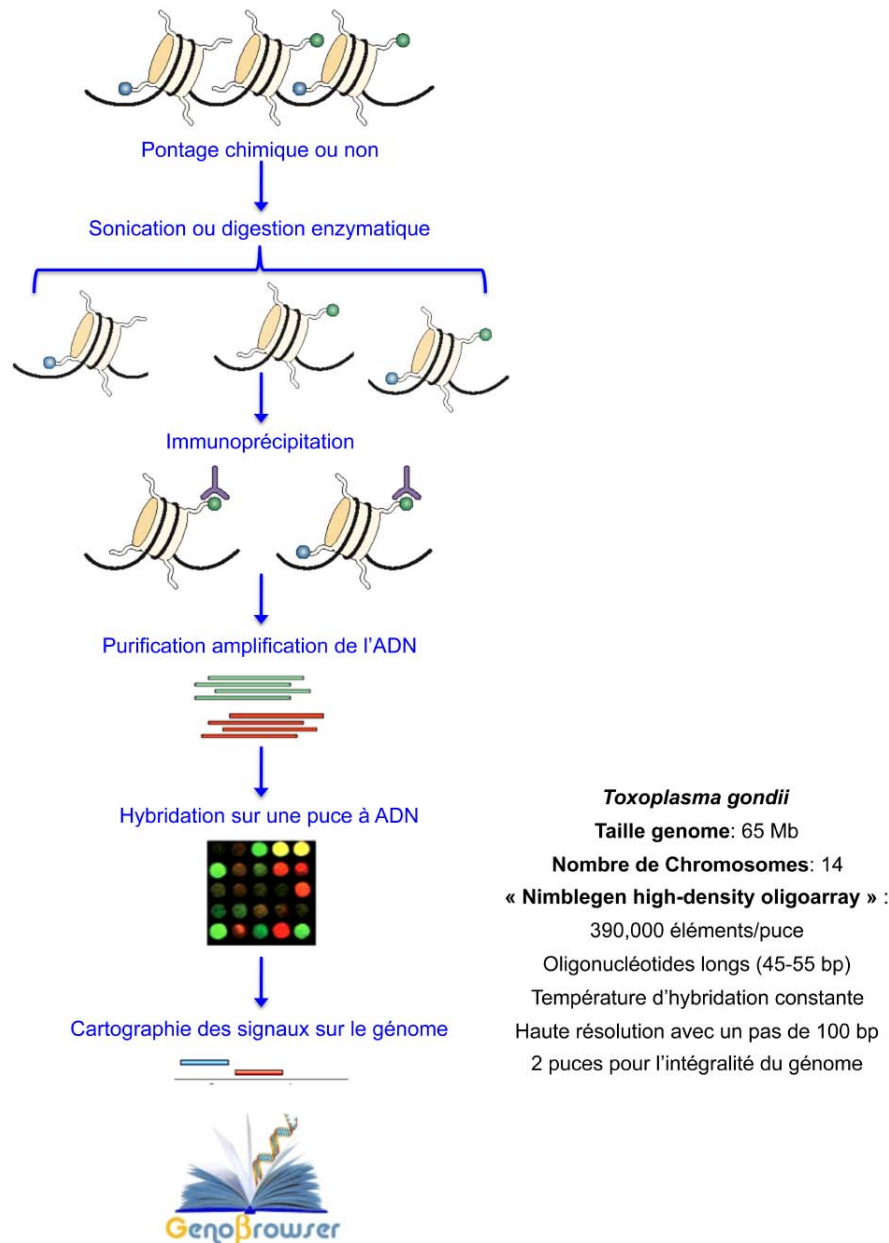


Figure 18 : La technique de ChIP on Chip array.

La méthode de ChIP on Chip permet l'étude des protéines interagissant avec la molécule d'ADN. Il s'agit d'une combinaison de la technique de « Chromatin Immunoprecipitation » (ChIP) avec la méthode des puces à ADN (Chip). Le protocole comporte deux étapes : la partie ChIP, suivie d'une expérience classique sur puce. ChIP : 1) Fixation in vivo des protéines à l'ADN, en général en utilisant du formaldéhyde, 2) Fragmentation de l'ADN en brins courts par sonication, 3) Immunoprécipitation des complexes ADN-Protéines-Anticorps, élimination du surnageant (i.e. ADN non associé à la protéine d'intérêt), 4) Séparation du complexe ADN-protéines pour ne garder que l'ADN. On obtient ainsi une collection de fragments d'ADN d'assez courte taille et dont on sait qu'ils interagissent avec la protéine d'intérêt. La méthode ChIP est suivie, dans la technique de « ChIP on Chip », d'une analyse sur puce. Il est néanmoins à noter que l'utilisation de puces à ADN pour l'identification et la caractérisation des fragments n'est pas obligatoire. On peut aussi utiliser une PCR classique pour identifier des fragments connus et vérifier leur présence ou leur absence (Scanning ChIP).

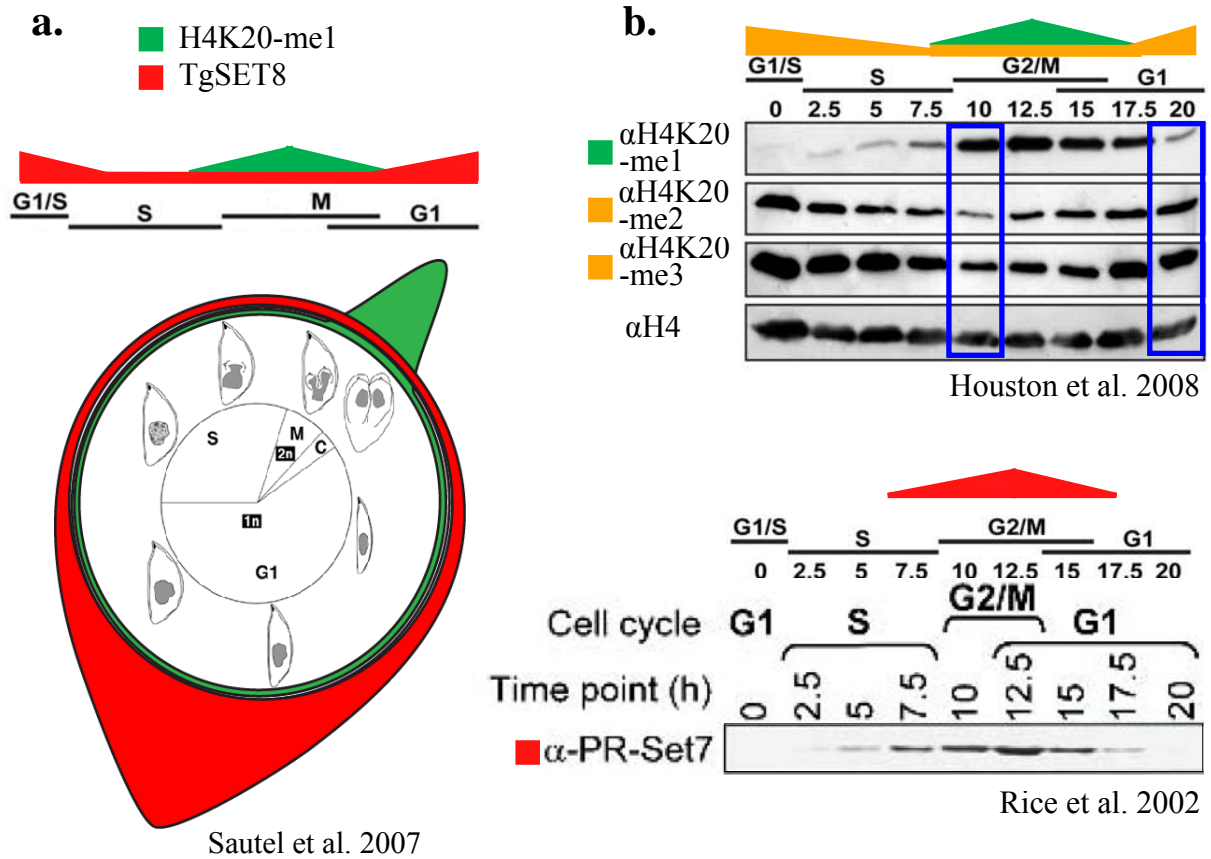


Figure 19 : Les différents états de méthylation de H4K20 au cours du cycle cellulaire.

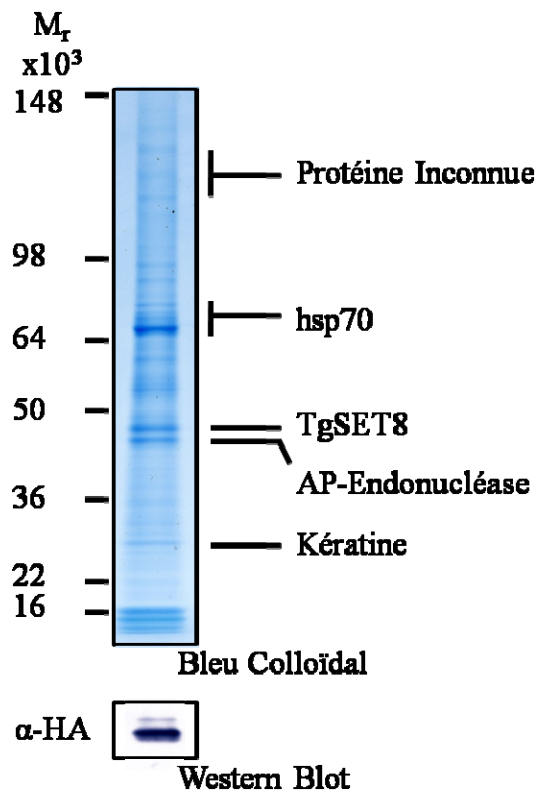


Figure 20 : Détermination de l'interactome spécifique de TgSET8.

Figure 19 : Analyse des différents états de méthylation de H4K20 au cours du cycle cellulaire.

a. Chez *Toxoplasma gondii* la modification H4K20-me1 marque la phase M alors que TgSET8 elle, est abondante en G1.

b. Chez les mammifères la modification H4K20-me1 et l'enzyme SET8 sont abondantes en G2/M ; ce qui correspond aux phases où les quantités de H4K20-me2 et H4K20-me3 sont les moins abondantes.

Figure 20 : Détermination de l'interactome spécifique de TgSET8.

La fraction enrichie en TgSET8 issue d'une chromatographie d'affinité anti-Flag est précipitée au TCA, séparée sur SDS-PAGE, révélée par coloration au bleu de Colloïdal. Les protéines présentes dans les bandes excisées du gel sont identifiées par séquençage par spectrométrie de masse (Collaboration J. Garin, EdYP). L'enrichissement en TgSET8 est contrôlé par western-blot avec l'anticorps α -HA.


ToxoDB Gene ID	Nom						
		Amont	5'	exon	intron	3'	Aval
44.m00009	p30 (SAG1)	*	*	*			
44.m00010	SRS2	*		*			
59.m00089	p24 GRA1	*	*	*	*	*	*
42.m00015	p28 GRA2	*	*	*	*	*	*
42.m00013	GRA3	*	*				*
20.m00005	GRA7		*		*	*	*
65.m01111	NTP2		*		*		
80.m00012	MIC1	*	*	*	*	*	*
33.m00006	M2AP	*		*	*	*	*
20.m00002	MIC2	*	*				*
25.m00006	MIC4	*					
65.m00002	TgMIC5	*					
20.m05914	MIC11		*				*
55.m00005	AMA1	*	*	*	*	*	*
20.m00387	SUB1	*					
83.m00004	G6PDH	*					*
145.m00002	Histone H2A F/Z	*					
547.m00089	Uracil-DNA glycosylase	*	*	*	*	*	*
8.m00002	HXGPRTase						
86.m00385	Ubiquitin-transferase			*		*	
80.m00003	G3PDH	*	*	*	*		
59.m06089		*					
145.m00748			*	*			
67.m00007				*	*		*
33.m01321		*		*			
41.m01274							
35.m00850		*	*	*	*		
80.m03939 ou 80.m02161		*	*	*	*	*	*

Tableau 4 : Gènes cibles de TgSET8 identifiés par CHIP on Chip.

Figure 22 : Inactivation de l'activité peroxydase des 2-Cys peroxyredoxines

a. La dualité de fonction des 2-Cys Prxs.

Dans des cellules de mammifère en croissance normale, la production de H_2O_2 est transitoire, les 2-Cys Prx contrôlent efficacement la concentration en H_2O_2 par une réaction couplée à une thiorédoxine (Trx) et une thiorédoxine réductase (TrxR). Lors d'un stress oxydatif, les 2-Cys Prxs initient un cycle de prise en charge de H_2O_2 mais ne peuvent pas échapper à l'hyperoxydation de la cystéine (Cp) qui conduit à la formation d'un acide sulfinique ($-SO_2H$). Les 2-Cys Prxs hyperoxydées multimérisent en un complexe chaperon de haut poids moléculaire. Lorsque le stress oxydatif s'atténue, les 2-Cys Prxs hyperoxydées sont converties progressivement par des sulfiredoxines, en peroxydases actives en présence d'ATP (Cp : peroxidatic cysteine ; Cr : resolving cysteine) (Adapté de Kang et al., 2005).

b. Différences de structure entre des Prxs robustes et sensibles à l'inactivation.

Alignement des séquences de TgPrx1 avec deux 2-Cys Prxs Humaines (Prx1 et Prx2) et deux 2-Cys Prxs bactériennes (*S.m.* : *Streptococcus mutant*; *E.c.* *Escherichia coli*). Les cystéines Cp et Cr impliquées dans l'activité peroxydase des Prxs sont conservées dans tous les organismes. Les motifs GGLG et YF confèrent aux Prxs la sensibilité à l'inactivation de l'activité peroxydase. Ces motifs sont absents chez les bactéries. TgPRX1 possède des motifs proches (GGIG et YL).

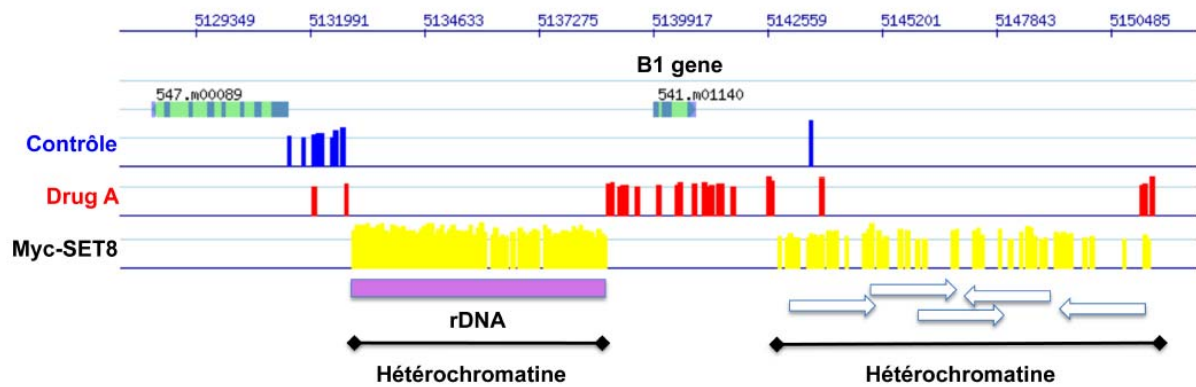


Figure 21 : Zoom sur le locus du pseudogène B1.

Le pseudogène B1 (541.m01140) est encadré par deux grandes régions d'hétérochromatine marquées constitutivement par la méthylation de H4K20 (en jaune Myc-TgSET8, Sautel et al. 2007). Ces régions contiennent soit de l'ADN codant pour des ARN ribosomiques, soit des régions répétées de type satellites. Sous l'effet d'un inhibiteur d'HDAC (la molécule A), les nucléosomes du locus B1 sont hyperacétylés mais la propagation de l'acétylation semble s'arrêter aux frontières de l'hétérochromatine constitutive marquée par TgSET8.

Fonctions de la méthylation des différents résidus d'histone		
Histone Lysine	Fonction (s)	Histone lysine Méthyltransférase
H1K26	Répression de la transcription	<i>Hs EZH2</i>
H3K4	Activation de la transcription Activation et élongation de la transcription Activation de la transcription Activation de la transcription (associée à la méthylation de H4K20 et H3K9 par ASH1)	<i>Dm Trx ; Hs MLL1, MLL2, MLL3</i> <i>Hs SET1 ; Sc SET1</i> <i>Hs SET7/9</i> <i>Dm ASH1</i>
H3K9	Répression de l'hétérochromatine et de l'euchromatine; méthylation de l'ADN Répression de l'euchromatine; méthylation de l'ADN Répression de l'euchromatine Répression de l'hétérochromatine et méthylation de l'ADN Répression de l'hétérochromatine et méthylation de l'ADN Activation de la transcription (associée à la méthylation de H4K20 et H3K4 par ASH1)	<i>Dm Su(var)3-9; Hs et Mm SUVAR39H1 et SUVAR39H2; Sp CL4</i> <i>Hs et Mm G9a; Hs GLP1</i> <i>Hs et Mm ESET (SETDB1)</i> <i>Nc DIM-5</i> <i>At KRYPTONITE</i> <i>Dm ASH1</i>
H3K27	Répression de l'euchromatine Répression de l'euchromatine	<i>Dm E(z); Hs EZH1 et EZH2</i> <i>Hs et Mm G9a</i>
H3K36	Répression et élongation de la transcription Régulation de la transcription	<i>Sc SET2</i> <i>Mm NSD1</i>
H3K79	Délimite l'euchromatine	<i>Sc et Hs DOT1</i>
H4K20	Répression à certains stade du cycle cellulaire, mitose et cytokinèse Répression de l'hétérochromatine Régulation de la transcription Activation de la transcription (associée à la méthylation de H3K4 et H3K9 par ASH1) Recrutement de la protéine de contrôle Crb2 au niveau des sites de réparation de l'ADN	<i>Hs et Dm SET8</i> <i>Dm, Mm et Hs SUV4-20H1 et SUV4-20H2</i> <i>Mm NSD1</i> <i>Dm ASH1</i> <i>Sp SET9</i>

Tableau 3 : Les résidus lysines méthylés et leurs fonctions.

Tableau résumant les différents résidus lysines méthylés, leurs fonctions et les lysines méthyltransférases associées. Abréviations : *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; *Hs*, *Homo sapiens*; *Mm*, *Mus musculus*; *Nc*, *Neurospora crassa*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Sp*, *Schizosaccharomyces pombe* (Adapté de Dillon et al., 2005).

SET8-Mediated Methylations of Histone H4 Lysine 20 Mark Silent Heterochromatic Domains in Apicomplexan Genomes^{∇†}

Céline F. Sautel,¹ Dominique Cannella,¹ Olivier Bastien,¹ Sylvie Kieffer,⁴ Delphine Aldebert,¹ Jérôme Garin,⁴ Isabelle Tardieux,³ Hassan Belrhali,² and Mohamed-Ali Hakimi^{1*}

UMR5163/CNRS-Joseph Fourier University, Jean-Roget Institute, Grenoble F-38042, France¹; EMBL-Grenoble Outstation, Grenoble F-38042, France²; Institut Cochin, Paris F-75014, France³; and INSERM ERIT, M 0201, CEA, Grenoble, France⁴

Received 20 March 2007/Returned for modification 3 May 2007/Accepted 5 June 2007

Posttranslational histone modifications modulate chromatin-templated processes in various biological systems. H4K20 methylation is considered to have an evolutionarily ancient role in DNA repair and genome integrity, while its function in heterochromatin function and gene expression is thought to have arisen later during evolution. Here, we identify and characterize H4K20 methylases of the Set8 family in *Plasmodium* and *Toxoplasma*, two medically important members of the protozoan phylum *Apicomplexa*. Remarkably, parasite Set8-related proteins display H4K20 mono-, di-, and trimethylase activities, in striking contrast to the mono-methylase-restricted human Set8. Structurally, few residues forming the substrate-specific channel dictate enzyme methylation multiplicity. These enzymes are cell cycle regulated and focally enriched at pericentric and telomeric heterochromatin in both parasites. Collectively, our findings provide new insights into the evolution of Set8-mediated biochemical pathways, suggesting that the heterochromatic function of the marker is not restricted to metazoans. Thus, these lower eukaryotes have developed a diverse panel of biological stages through their high capacity to differentiate, and epigenetics only begins to emerge as a strong determinant of their biology.

The fundamental unit of chromatin, termed the nucleosome, is subject to a dizzying array of posttranslational modifications, which work alone or in combination to constitute a histone code that regulates chromatin structure and function (18). Among these modifications, lysine methylations index chromatin regions, facilitating epigenetic organization of eukaryotic genomes. In contrast to other histone-modifying enzymes, histone lysine (K) methyltransferases (HKMTs) are enzymes devoted to the methylation of highly specific lysine residues which either promote gene activation (H3K4, H3K79, and H3K36) or generate a repressed chromatin state (H3K9, H3K27, and H4K20). With just one exception (Dot1p), these enzymes belong to the SET family. The SET domain, which initially took its name from the *Drosophila* genes *Su(var)3-9*, *enhancer of zeste*, and *trithorax*, is crucial for the catalytic activity of HKMTs (3, 9, 24). While lysine methylation mainly occurs on histone H3 tails, the only lysine residue of histone H4 shown to be methylated *in vivo* is lysine 20. Methylation of H4K20 is involved in a diverse array of nuclear processes, including gene silencing (12, 26), pericentric heterochromatin formation (37), mitotic regulation in metazoans (20, 21), and DNA damage checkpoint control in the cell cycle of *Schizosaccharomyces pombe* (35).

A number of different SET proteins have been identified as being able to methylate H4K20, including metazoan Set8 (also

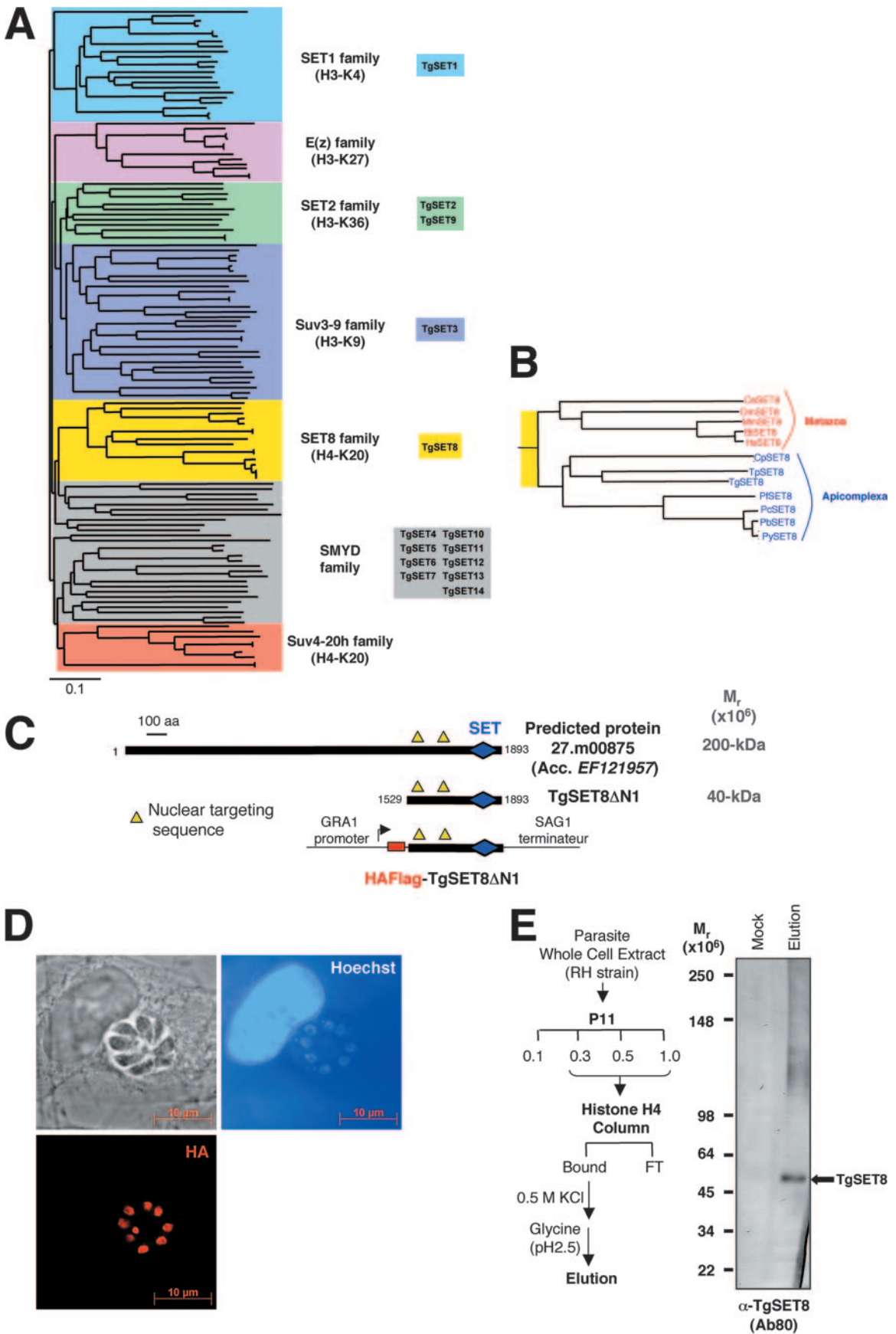
named Pr-Set7) (12, 26), *Drosophila* ASH1 (2), murine NSD1 (30), mammalian SUV4-20H1/2 (37), and its *S. pombe* ortholog SET9 (35). The modification is evidently absent in several simple eukaryotes, such as *Saccharomyces cerevisiae* and the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila* (26). H4K20 methylation by SET9 was, however, reported in *S. pombe*, where it does not act on the regulation of gene expression or heterochromatin function but is instead required for the recruitment of the checkpoint protein Crb2 to sites of DNA damage (35). Thus, the role of H4K20 methylation in DNA repair and genome integrity can be considered an early evolutionary function whereas the heterochromatin function of the marker arose later in evolution in response to increasing genome complexity. This argument prompted us to look for the presence of the marker (H4K20 methylation) in early-branching eukaryotic cells within the *Apicomplexa* phylum.

Apicomplexa is a phylum of unicellular parasites that includes important human pathogens like *Plasmodium* species, the causative agents of malaria, and *Toxoplasma gondii*, a common cause of congenital ocular and cerebral diseases, as well as of severe encephalitis in immunocompromised individuals. An obligatory intracellular lifestyle has been adopted by these parasites as a successful immune evasion mechanism. As a consequence, they have evolved a number of properties that allow them to survive and grow under several host cell conditions throughout their life cycle. The development of several biological stages that express different sets of genes following a differentiation phase has been key in their success. These parasites possess a rich but still largely unexplored repertoire of enzymes the functions of which are associated with epigenetics and chromatin remodeling. These processes are expected to be extensively used given the multiple life cycle stages of these parasites (11, 13, 34, 41).

* Corresponding author. Mailing address: Epigenetic and Parasites ATIP Group, UMR5163, LAPM, Institut Jean Roget, BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9, France. Phone: (33) 4 76 63 74 69. Fax: (33) 4 76 63 74 97. E-mail: Mohamed-Ali.Hakimi@ujf-grenoble.fr.

† Supplemental material for this article may be found at <http://mc.manuscriptcentral.com/mcb.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 11 June 2007.



In this report, we first describe the identification and functional analyses of a novel apicomplexan family of histone methyltransferases (HMTases) specific for H4K20 methylation. Unexpectedly, we identified parasite proteins with significant matches to human Set8, while no Suv4-20 h orthologs were found. Even more surprising, biochemical and structural modeling analyses demonstrated that *T. gondii* Set8 (TgSet8) can transfer mono-, di-, and trimethyl H4K20 sequentially, whereas its human counterpart is exclusively found as a monomethylase. Additionally, TgSet8 and the monomethylated marker are cell cycle regulated. Importantly, we established by chromatin immunoprecipitation (ChIP) that both TgSet8 and the repressive methylation markers on H3K9 and H4K20 are localized at heterochromatic domains such as silenced rRNA gene, satellite repeat, and telomeric regions. Collectively, our findings provide new insights into the evolution of Set8-mediated biochemical pathways, suggesting that the heterochromatic function of the marker is not restricted to metazoans.

MATERIALS AND METHODS

Parasite methods. Standard laboratory methods and techniques for *T. gondii*, *Neospora caninum*, and *Plasmodium* sp. manipulations were used. RH strains of *Toxoplasma* were grown in human foreskin fibroblasts, transfected, and cloned by limiting dilution as described previously (34). The *RHhxprt* mutant strain used in these studies contains a defective hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase (*HXGPRT*) gene or lacks the gene, which allows the selection of transfected tachyzoites with mycophenolic acid (10).

Immunofluorescence assay and Western blot analysis. Immunofluorescence assays and immunoblotting with alkaline phosphatase was performed as described previously (34).

In vitro HMTase assay. Recombinant protein rTgSET8ΔN1 and its derivatives were purified from bacteria as described previously (34). Histidine-tagged histone H4 was purified from bacteria as described previously (42). Core histones and mononucleosomes were extracted from tachyzoites (*T. gondii* strain RH). Protein samples (rTgSET8, rTgSET8 mutant forms, Suv4-20h1, or PrSET7) were incubated with recombinant histone H4 or free core histones at 30°C for 60 min in methyltransferase buffer (final concentrations, 50 mM Tris-HCl [pH 8.5], 0.5 mM dithiothreitol, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) and 0.1 mM *S*-adenosyl-L-methionine (Sigma) as previously described. The reaction was stopped by addition of sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer, and the reaction mixtures were analyzed by 10% to 20% gradient SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by Western blotting with antibodies to H4K20me1 (39), H4K20me2 (39), and H4K20me3 (ab9053; Abcam).

RESULTS

Identification of a new family of HMTase related to human Set8 in apicomplexan parasites. The SET domain is likely to have arisen early in eukaryotic evolution. The domain is present in multiple copies in all currently available eukaryotic proteomes, including all of the crown group taxa, and various earlier diverging protist lineages (1). Phylogenetic analysis indicates that there was significant duplication and divergence of SET domain proteins in the *Apicomplexa* lineage. Surprisingly,

a survey of available genomic databases indicates that Set8 homologs arose predominantly in all of the *Apicomplexa* members examined so far, suggesting that this orphan member is not restricted to metazoans, as previously thought (Fig. 1A and B, yellow colored). Intriguingly, no homologs were found in ciliates (26) and dinoflagellates although there is a great deal of sequence information available for the large clade of *Alveolata*, which contains the ciliates, dinoflagellates, and apicomplexans. Absence of Set8 in ciliates can be explained by subsequent loss of the gene for Set8 in that lineage. This is a common phylogenetic occurrence; for example, dinoflagellates, which are frequently considered relatives of *Apicomplexa*, have lost histones altogether (15). This apparent paradox can be alternatively explained by a lateral genetic transfer during which the apicomplexan ancestor acquired a Set8-related gene from a host belonging to the animal lineage. Such a transfer is highly supported by the intracellular location of apicomplexan parasites for most of their life cycle, and it has been already exemplified with other apicomplexan proteins characterized as reminiscent of animal proteins (27, 43).

The predicted *TgSet8* gene (27.m00875; <http://ToxoDB.org>) encodes a predicted protein of 1,893 amino acids (202 kDa) that harbors a conserved C-terminal SET domain (Fig. 1C). However, biochemical purification shows the appearance of a single polypeptide of approximately 55 kDa (Fig. 1E), suggesting that the product of 27.m00875 was mispredicted. We then cloned a partial-length cDNA encoding the C-terminal domain of the protein and encompassing both putative nuclear localization signals (TgSet8ΔN1 amino acid residues 1529 to 1893; 40-kDa). We consider here that the recombinant TgSet8ΔN1 is almost equivalent to the native protein. Immunofluorescence analysis of stable transgenic parasites (strain RH) ectopically expressing recombinant TgSet8ΔN1 dually tagged with hemagglutinin (HA) and Flag verifies the exclusive nuclear localization of TgSet8 (Fig. 1D). Multiple attempts to generate a knockout of the *TgSet8* gene failed, suggesting that the gene may be essential in tachyzoites (data not shown).

TgSet8 defines a new family of HKMTs that mono-, di-, and trimethylate lysine 20 of histone H4. To begin defining the role of TgSet8, we initially asked whether or not histone H4 is methylated at lysine 20 in *T. gondii*. Immunoblotting with a panel of H4K20 methyl-specific antibodies showed that native histone cores were specifically mono-, di-, and trimethylated (Fig. 2A; see Table S2 in the supplemental material). We therefore hypothesize that TgSet8 is inherently involved in H4K20 methylation. Recombinant TgSet8ΔN1 purified from *Escherichia coli* methylated only histone H4 (as free histone) and not H2A, H2B, or H3, indicating that TgSet8ΔN1 has intrinsic HMTase activity and retains its substrate specificity (Fig. 2C). As lysine 20 can be mono-, di-, or trimethylated, we

FIG. 1. A new SET8 family. (A) Schematic dendrogram showing the relationships among some of the better-characterized SET domain proteins. For a more detailed phylogenetic tree, see Fig. S1 in the supplemental material. Major lineages of the SET domain and *T. gondii* TgSet8 proteins are indicated next to the tree. (B) Expanded representation of the new SET8 family branch. (C and D) Costaining with anti-HA antibody and Hoechst 33258 of human fibroblast cells infected with transgenic *T. gondii* strain RH::HA-Flag-TgSet8. The transgene is driven by the parasite-specific strong promoter *GRA1*. aa, amino acids; Acc., accession no. (E) *T. gondii* whole-cell extract was fractionated by chromatography, and the fraction shown by an arrow was used for histone H4 affinity purification, followed by Western blotting with a specific antibody raised against TgSet8.

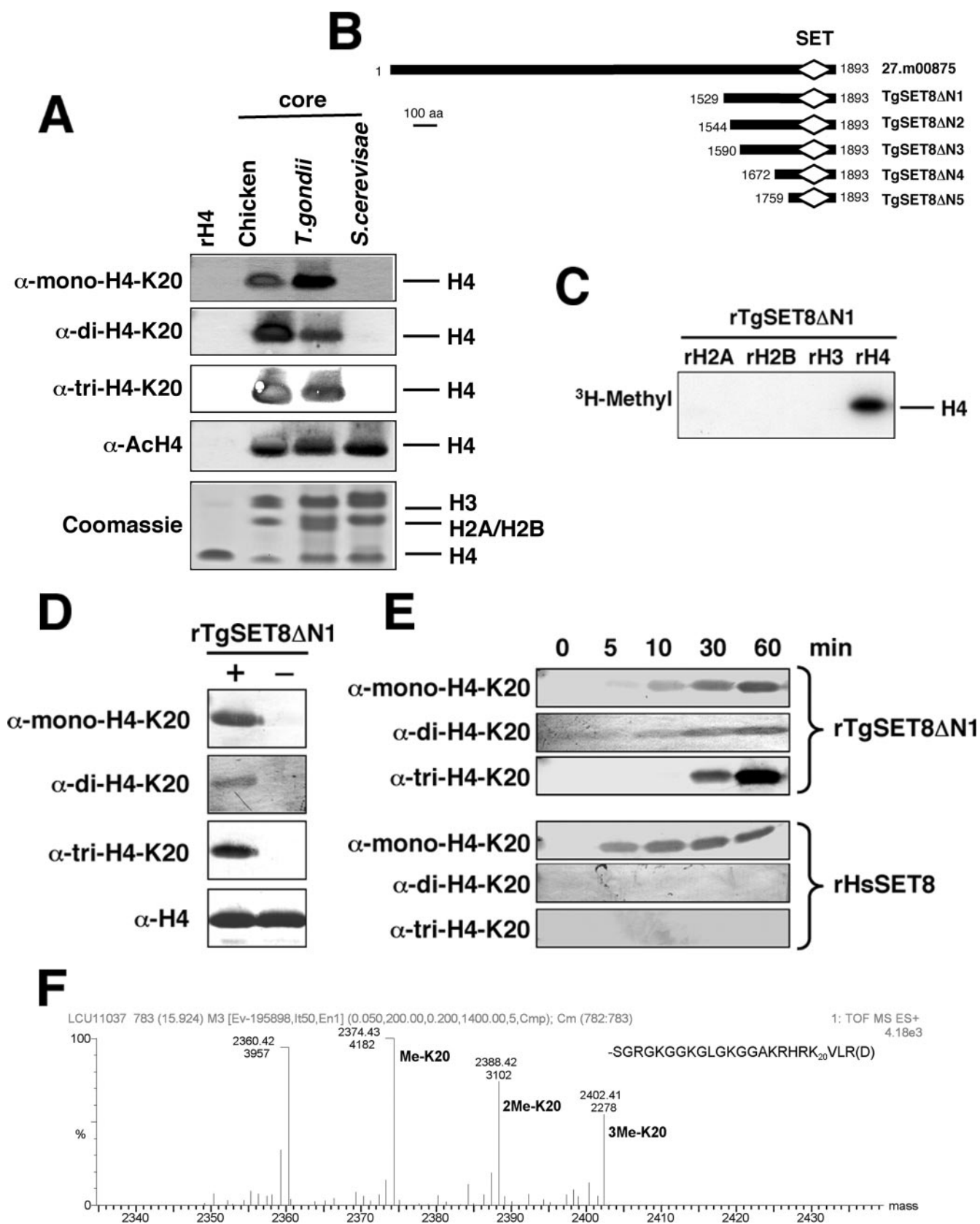


FIG. 2. Methylation of *T. gondii* H4K20 is mediated by TgSet8. (A) Histones were extracted from the indicated organisms and fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. (Top) Western blot analysis with antibodies against H4K20me1 (39), H4K20me2 (Ab1, Upstate 07-441; Ab2, reference 39; Ab3, Abcam ab9052), H4K20me3 (Abcam ab9053), and unmodified histone H4 (Abcam ab4559). (Bottom) Coomassie staining

next investigated the methylation state of the TgSet8 Δ N1 reaction products. First, we showed a clear enrichment for H4K20me1 but also di- and trimethylation of the residue (Fig. 2D). This result was unexpected since the mammalian counterpart, Set8, is known to catalyze H4K20me1 exclusively (8, 46, 47). Secondly, the kinetics of the TgSet8 Δ N1 products show that while H4K20me1 increased over time—as for its human counterpart—TgSet8 Δ N1 remarkably displayed a direct progression to H4K20me3 with a relative accumulation of dimethyl products (Fig. 2E). To confirm the product specificity of rTgSet8 Δ N1, we conducted HMTase assays and subjected aliquots of the reaction mixture to mass spectrometry to determine the methylation state of lysine 20 in recombinant histone H4. The data indicate a shift in the mass/charge (m/z) ratio of the digested H4 peptide from 2,360 (unmethylated) to 2,374 (one methyl), 2,388 (two methyls), and 2,402 (three methyls) (Fig. 2F). Thus, rTgSet8 Δ N1 is a bona fide histone H4K20 mono-, di-, and trimethylase. A key question remains what the structural basis of TgSet8 substrate specificity and methylation multiplicity is.

Mutation V1875Y at the catalytic site of TgSet8 ablates trimethylase activity. The active-site architecture is strongly conserved between TgSet8 and HsSet8, allowing us to use the HsSET8 structure (1zkkA) in complex with the histone H4 10-residue peptide and the *S*-adenosyl-L-homocysteine (SAH) methyl donor cofactor product moiety to model a TgSet8 Δ N5-SAH-lysine 20 complex (Fig. 3C and D). The HsSet8 lysine-binding pocket walls are mainly formed by two sequence stretches, Cys270 to Tyr274 and Tyr334 to Tyr336. Tyr245 is located at the distal end of the pocket, where lysine 20 is bound in an extended all-*trans* conformation and His18 of the peptide substrate is closing the top of the cavity. The TgSet8 Δ N5 lysine-binding pocket residues are either strictly conserved (Tyr245 and Tyr336 in HsSet8, corresponding, respectively, to Tyr1779 and Tyr1877 in TgSet8) or changed to space-filling analogs, i.e., Tyr271 and Tyr273 in HsSet8, corresponding to Phe1806 and Phe1808 in TgSet8, respectively (Fig. 3C and D).

The only and noticeable exception is the HsSet8 Tyr334 amino acid, which becomes Val1875 in TgSet8. This substitution widely opens the K20 imidazole group binding pocket (Fig. 3D) and, together with the Tyr-to-Phe double substitutions described above, makes the pocket largely hydrophobic. It is interesting, moreover, that Phe1806 partially fills the hole created by the tyrosine-to-valine (1875) substitution in TgSET8 and also enforces the hydrophobic character of the K20 imidazole group binding site (Fig. 3D). *Neurospora crassa* DIM-5 histone H3-K9 trimethyltransferase has been structurally characterized in complex with the SAH cofactor product and the K9 peptide (48). Comparison of the DIM-5 and HsSet8 active

sites also reveals hydrophobic substitutions, namely, Tyr273 to Phe206 and Tyr334 to Phe281 (Fig. 3D).

Changing Val1875 to a tyrosine in TgSet8 was then expected to lead to a narrowed and polar active-site distal extremity, as in the case of HsSet8, and hence to reduced trimethylase activity. Interestingly, time course experiments indicated that the reaction by V1875Y stalled at the mono- and dimethyl stage, while H4K20me3 still increased over time for the wild-type enzyme (Fig. 4B). Remarkably, the V1875Y mutation changed the product specificity of TgSet8 from a fast mono- or trimethyltransferase to a predominantly mono-HMTase with a slow dimethyltransferase activity without affecting its overall catalytic activity. Similarly, while *Neurospora* DIM-5 generates primarily H3K9me3, the mutation F281Y confines the enzyme to mono- and dimethylation (49). Likewise, mammalian G9a is converted from a fast mono- or di-HMTase with slow tri-HMTase activity to a predominantly mono-HMTase by the F1205Y mutation (6).

F1808Y mutation in the catalytic site unbalances the ratio of mono- to trimethylation. Several structural studies have shown that a conserved Tyr or Phe residue within the SET domain could be the key determinant specifying whether a SET domain catalyzes mono-, di-, or trimethylation (28). We noticed that a change of Phe to Tyr at position 1808 drastically enhanced trimethylation activity in vitro (Fig. 4C). Time course experiments showed that the trimethylated forms accumulate earlier in the reaction for the TgSet8 Δ N1(F1808Y) mutant than for the wild type (2 min versus 30 min, respectively; Fig. 4B to D). Additionally, the yield of monomethylation decreased considerably in the reaction catalyzed by the mutated protein, whereas dimethylation increased significantly. Remarkably, the F1808Y mutation confines the enzyme in vitro to mediating trimethylation.

In light of the modeling that clearly reveals a wider and more hydrophobic lysine binding site, we have modeled the F1808Y substitution of TgSET8 (Fig. 4, compared panels A and C). This mutation is located right at the pocket entrance and more than 8 Å away from the lysine amine group. This reduced lysine channel diameter might make it more difficult for the lysine to enter but also more difficult for it to exit. Moreover, the Tyr1808 hydroxyl group does not face any proton acceptor in the protein active site; hence, it might be able to interact with the peptide substrate, increasing the binding of the TgSET8 mutant with the histone tail. We then hypothesized that after entering and being monomethylated, the lysine amine group has plenty of space to reposition itself so that it gets di- and trimethylated sequentially. The F1808Y mutation would make protein-histone tail binding tighter and, at the same time, sterically more difficult to dissociate by reducing

of histones. Ach4, acetylated H4. (B) Schematic representation of N-terminal deletion mutant forms of TgSet8. The amino acid (aa) numbers for each construct and the SET domain are indicated. (C) HMTase assays with TgSet8 Δ N1 following incorporation of ^3H -labeled CH_3 into recombinant histone substrates rH3, rH4, rH2A, and rH2B. (D) HMTase assays of TgSet8 Δ N1 with recombinant His $_6$ -H4 were analyzed by Western blotting. No cross-reaction with recombinant H4 was observed. (E) Time course HMTase assays of TgSet8 Δ N1 and rHsSet8 (Upstate). Reactions of TgSet8 Δ N1 or rHsSet8 with recombinant His $_6$ -H4 were stopped at sequential incubation time points and analyzed by Western blotting. (F) Product specificity of rTgSet8 Δ N1 determined by mass spectrometry. Deconvoluted electrospray mass spectrum of the SGRGKGG KGLGKGGAKRHRK $_{20}$ VLR(D) peptide following AspN digestion as described in Materials and Methods. The molecular masses of the unmethylated and mono-, di-, and trimethylated peptides are marked above the peaks. (G) Gel filtration chromatographic analysis of recombinant TgSet8 Δ N1 with a Superdex 200 column. The eluted fractions were analyzed by Coomassie staining, Western blot analysis, and HMTase assay.

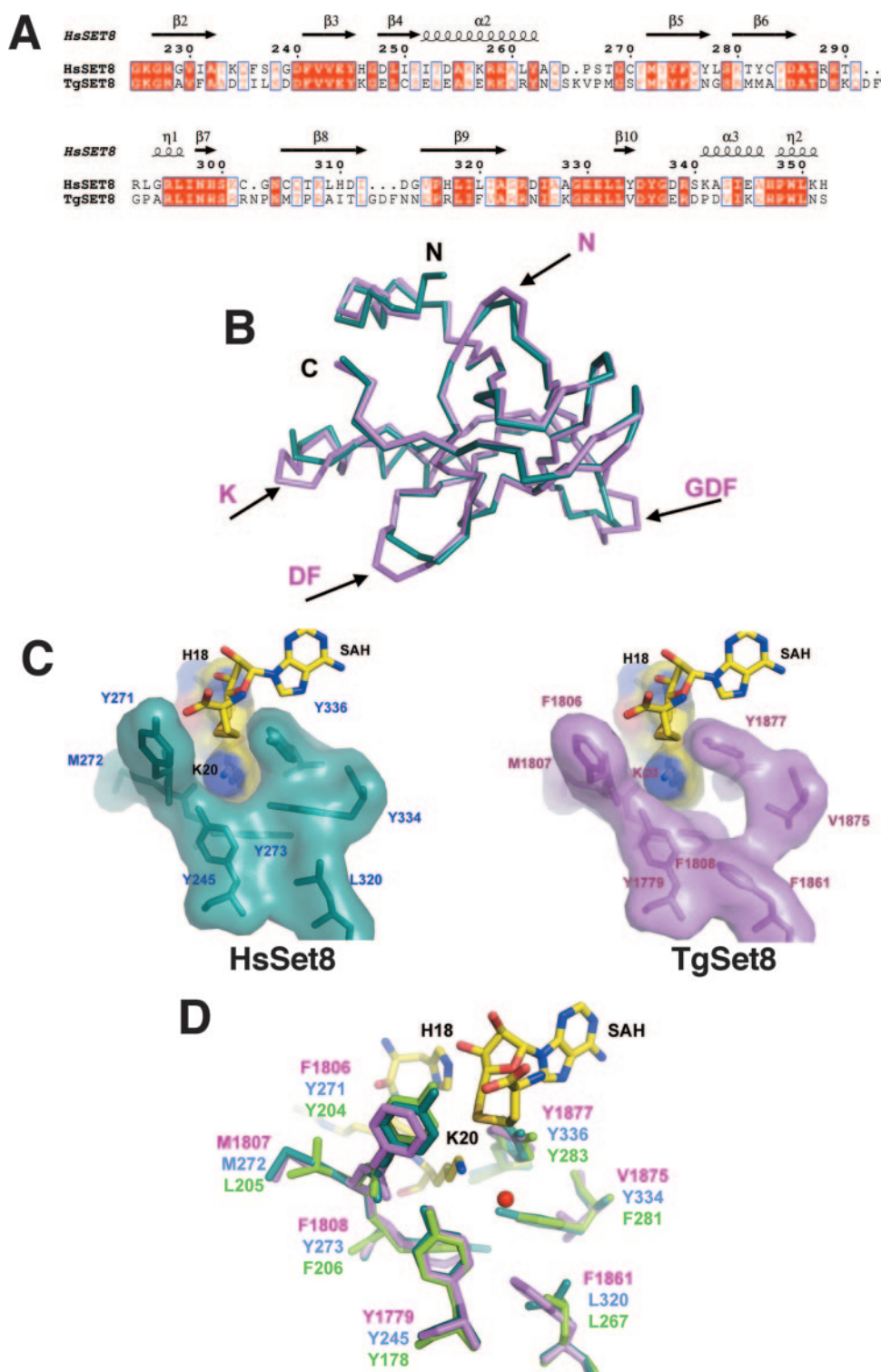


FIG. 3. Structural modeling of TgSet8 Δ N5(1759-1893). (A) Primary sequence alignment of HsSet8(225-352) and TgSet8 Δ N5(1759-1893) used for modeling with the program Modeler. The secondary-structure element annotations have been extracted from the HsSet8 IzkA Protein Data Bank structure (8). The image shown was produced with the program ESPRIT (14). (B) Superposition of the three-dimensional SET domains of HsSet8 (blue, IzkA) and the TgSet8 Δ N5 Modeler model (pink). The TgSet8 Δ N5 insertion sequences are indicated by arrows and the one-letter amino acid code. (C) The geometry and molecular environment of the lysine 20 binding site are shown for HsSet8 and TgSet8. (D) HsSet8 (blue), TgSet8 (pink), and DIM-5 (green) lysine 20 binding site residue superposition. The water molecule (red) belongs to the HsSet8 Protein Data Bank structure (IzkA).

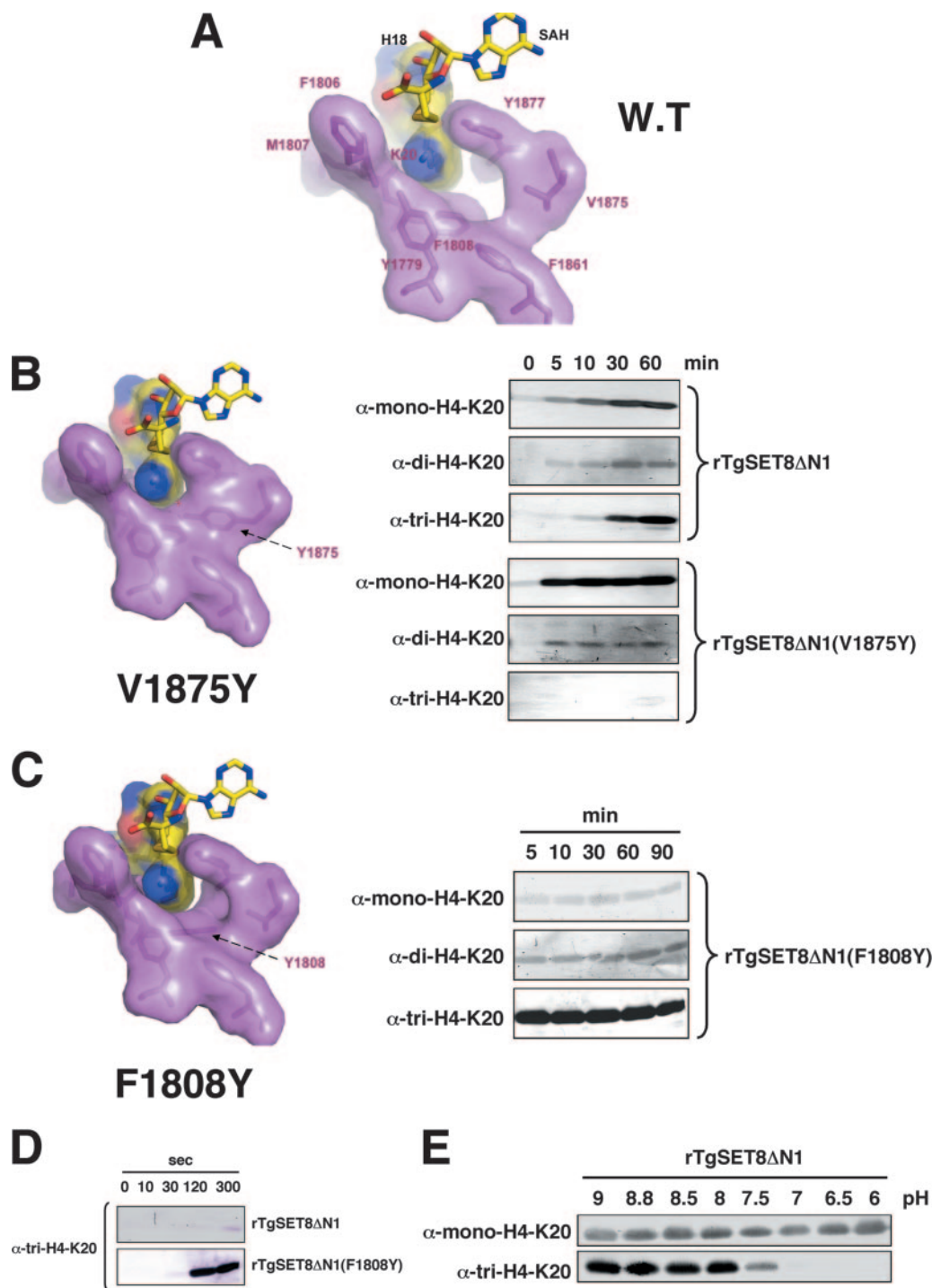


FIG. 4. Structural features of the TgSet8 catalytic site. The geometry and molecular environment of the lysine 20 binding site of wild-type (W.T.) (A) and mutant (B and C) TgSet8 are shown. (B) Time course HMTase assays of mutant TgSet8 Δ N1(V1875Y) versus wild-type TgSet8 with recombinant His₆-H4 and analysis by Western blotting. A weak H4K20me₂ signal is observed with long exposure times. (C and D) Time course HMTase assays of mutant TgSet8 Δ N1(F1808Y) versus wild-type TgSet8 with recombinant His₆-H4 and analysis by Western blotting. (E) Influence of pH on the multiplicity of TgSet8 Δ N1 on a His₆-H4 substrate.

entrance into and exit from the channel. In other words, the mutation may cause the lysine to be trapped inside the channel until it gets fully methylated.

For methylation to take place, the lysine side chain must be

deprotonated. Several studies have assumed that Set8 relies upon the small but rapidly exchanging population of deprotonated target lysines (46). We then examined the pH dependence of TgSET8. Whereas TgSet8 Δ N1 is able to monometh-

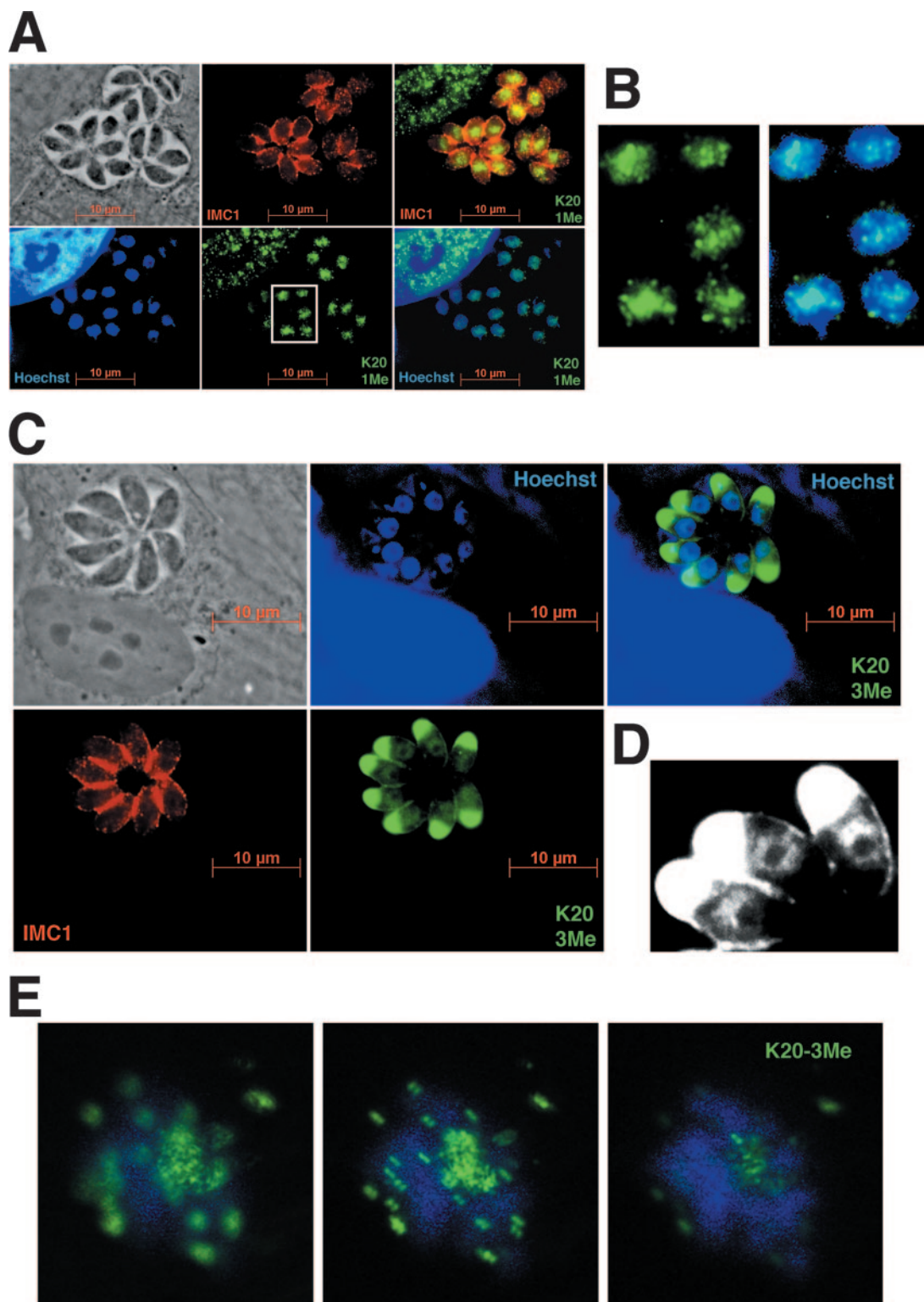


FIG. 5. H4K20me1 and H4K20me3 mark apicomplexan heterochromatin domains. (A) Costaining with anti-H4K20me1 antibody (green), anti-IMC1 antibody (red), and Hoechst 33258 (blue) of human fibroblast cells infected with *T. gondii* strain RH (tachyzoites). (B) Nuclear areas marked by H4K20me1 at a higher magnification. (C) Costaining with anti-H4K20me3 antibody (green), anti-IMC1 antibody (red), and Hoechst 33258 (blue) of human fibroblast cells infected with *T. gondii* strain RH (tachyzoites). (D) Nuclear areas marked by trimethyl H4K20me3 at a higher magnification. The cross-reactions at the apical end of *Toxoplasma* cells are frequently observed with antibodies raised against any trimethylated lysine residue. (E) Schizont stage *P. falciparum* parasites (strain 3D7) costained with anti-H4K20me3 antibody (green) and Hoechst 33258 (blue).

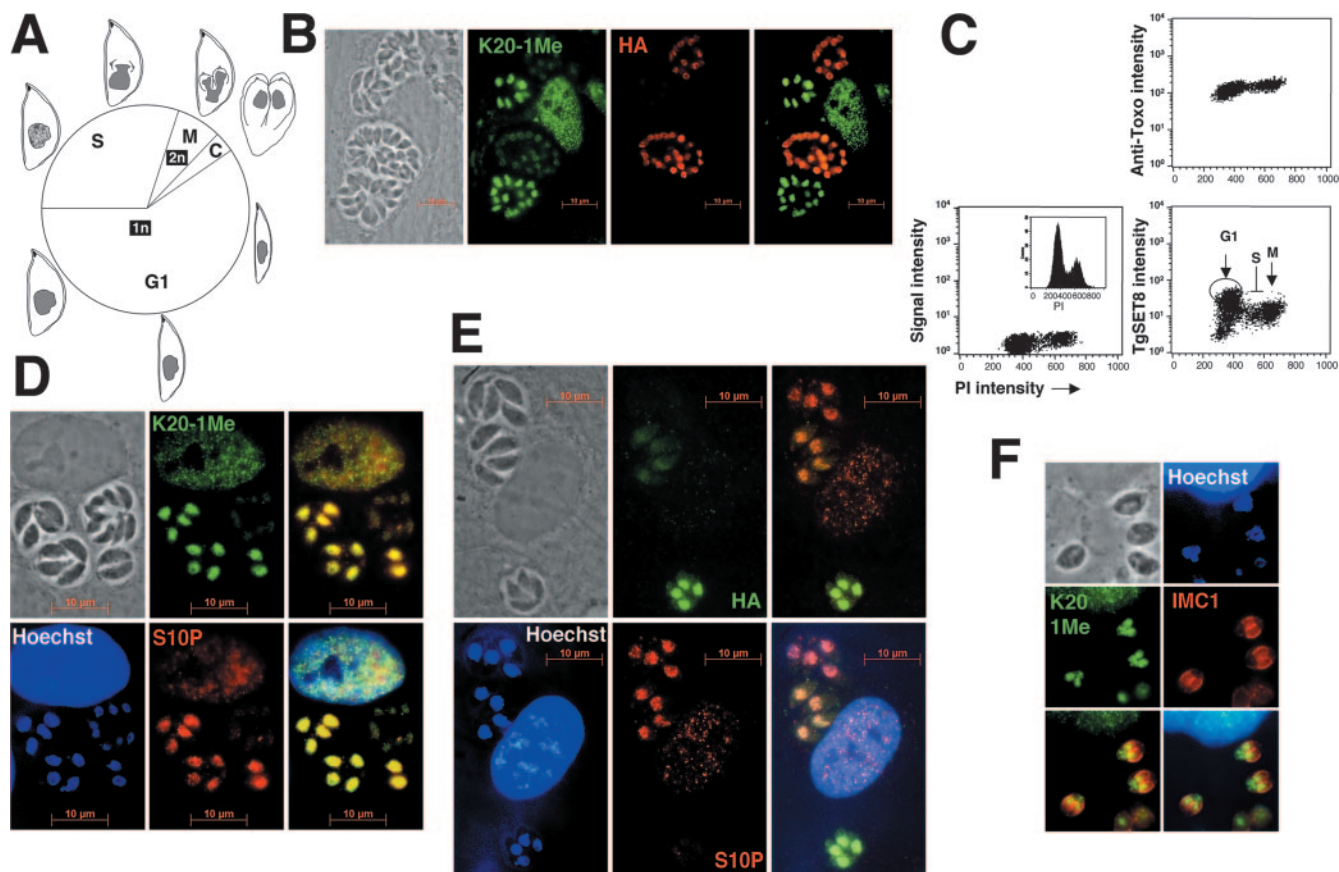
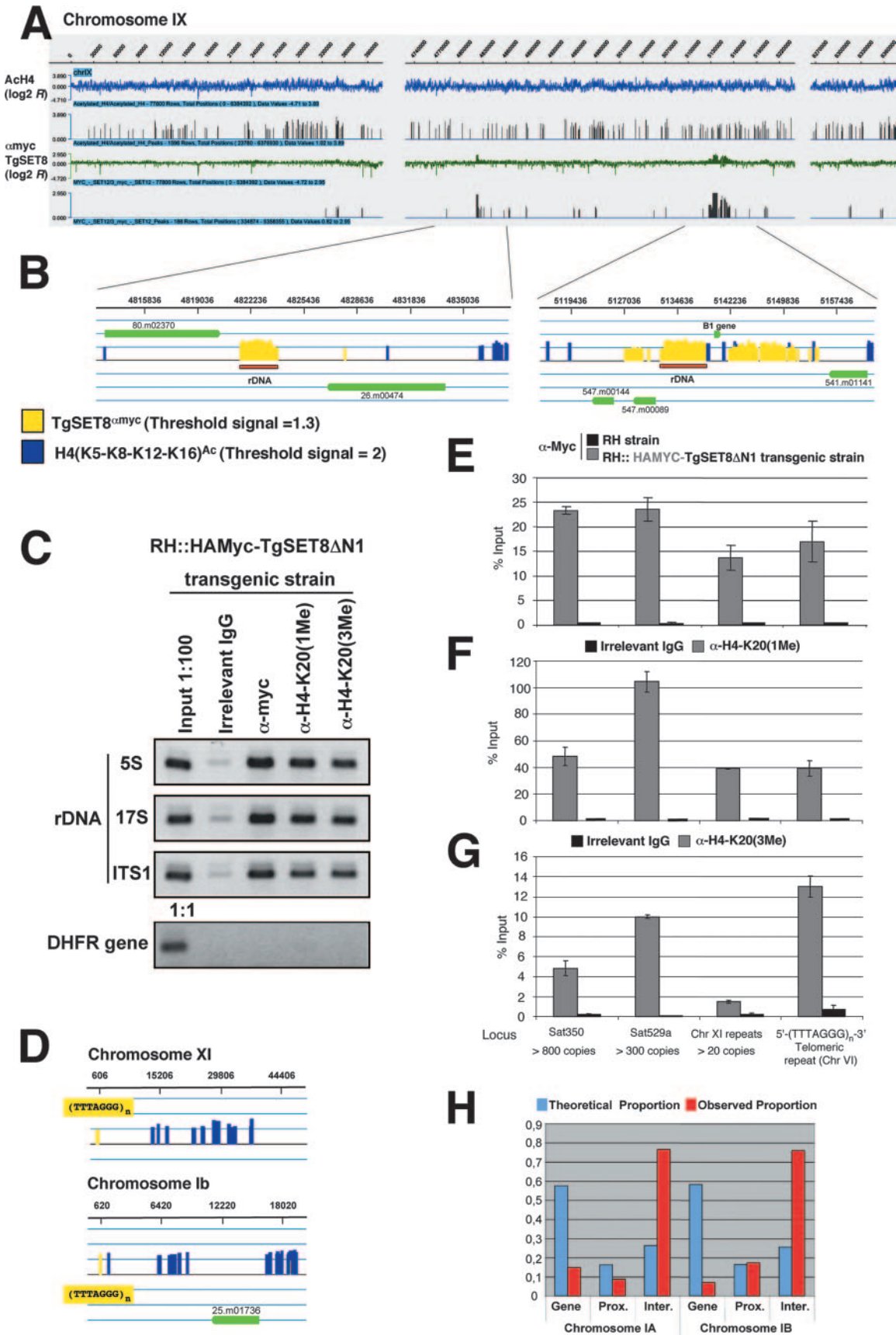


FIG. 6. The H4K20me1 marker is cell cycle regulated. (A) *T. gondii* cell cycle scheme. S, S phase; M, mitosis; C, cytokinesis. (B) Costaining with anti-HA antibody (red) and anti-H4K20me1 antibody (green) of human fibroblast cells infected with transgenic *T. gondii* strain RH::HA-Flag-TgSet8. (C) Fluorescence-activated cell sorter analysis of HA-Flag-TgSet8 Δ N1 protein level in relation to the cell cycle. Tachyzoites were labeled with anti-HA and anti-*Toxoplasma* antibodies. DNA contents were detected with propidium iodide (PI). The intensity of the antibody fluorescence signal is plotted against the propidium iodide signal. The circle indicates an increase in the intensity of TgSet8 Δ N1 expression in the tachyzoite G1 phase. (D) Costaining with anti-H3S10ph antibody (red), anti-H4K20me1 antibody (green), and Hoechst 33258 (blue) of human fibroblast cells infected with *T. gondii* strain RH. (E) Costaining with anti-H3S10ph antibody (red), anti-HA antibody (green), and Hoechst 33258 (blue) of human fibroblast cells infected with strain RH::HA-Flag-TgSet8. (F) Costaining with anti-IMC1 antibody (red), anti-H4K20me1 antibody (green), and Hoechst 33258 (blue) of human fibroblast cells infected with *T. gondii* strain RH (tachyzoites in mitosis).

ylate lysine 20 of histone H4 in a broad pH range (~6 to 9), its trimethylase activity only appears from pH 7.5 (Fig. 4E). We could hypothesize that the second and third K20 deprotonation processes, necessary for full trimethylation to carry on, require pH-dependent deprotonations of active-site residues. Taken together, these observations suggest that several residues forming the substrate-specific channel play an important role in the methylation multiplicity ability of the SET domain by defining the geometry, size, and hydrophobic character of the lysine binding pocket.

H4K20me1 and H4K20me3 mark heterochromatic regions in Apicomplexa. We next turned our attention to how H4K20 mono-, di-, and trimethylations are distributed in *T. gondii*, *N. caninum*, and *Plasmodium falciparum* parasites by using specific antibodies and confocal fluorescence microscopy. H4K20me1 antibodies stained *Toxoplasma* and *Neospora* chromatin with a broad nuclear distribution (Fig. 5A; see Fig. S3A in the supplemental material). At higher magnification, H4K20me1 staining showed a punctate pattern spread throughout the nucleus, most likely the pericentric heterochromatin (Fig. 5B; see Fig. S3B in

the supplemental material). In contrast, asexual erythrocytic stages of *P. falciparum* exhibited a weak monomethylation signal (data not shown). So far, no dimethylation immunofluorescent signal—with any available antibodies—was detected in parasite nuclei (data not shown), while the modification was readily visible by Western blotting (Fig. 2A). H4K20me3 was detected in *Toxoplasma* and *Neospora* nuclei as a ring structure with an accumulation primarily at the topmost nuclear periphery which is characteristic of perinuclear heterochromatin (Fig. 5C and D; see Fig. S3C to E in the supplemental material). Indeed, punctate, electron-dense bands of heterochromatin were commonly visualized at the periphery of *T. gondii* parasite nuclei (see Fig. S3F in the supplemental material). Immunostaining of *P. falciparum* young and mature schizonts revealed that the trimethylated marker was highly concentrated at some discrete foci, often grouped in pairs around the nucleus, suggestive of a telomeric signal (13) (Fig. 5E). Consistent with our data, the telomeres of *P. falciparum* were recently localized in the periphery of the nucleus, whereas acetylated H4 was found to be restricted to the center of the nucleus (see Fig. 3 in reference 13 and Fig. S3G in the supplemental



material). These data are suggestive but not conclusive. Indeed, Hoechst DNA staining does not have sufficient resolution—because of the tiny nuclei of apicomplexans—to support unequivocal colocalization of the markers with the chromatin domain. On the other hand, ChIP analysis (see below for details) verified that the enzyme and its markers colocalize at heterochromatin in *T. gondii*.

Relationship between H4-K20 monomethylation and cell cycle regulation in *Toxoplasma*. Constitutive heterochromatin is stably inherited and thus must contain one or more epigenetic markers to direct its maintenance during cell division. Since recent studies have reported that H4K20me1 decreases at mid-S phase and increases during mitosis whereas Set8 protein levels are steadily elevated through G₂ and peak during mitosis (31), we investigated whether H4K20me1 is cell cycle regulated in *T. gondii*.

While cell division occurs by binary fission in most organisms, including bacteria, plants, and animals, apicomplexan parasites divide by endodyogeny or schizogony from a single polyploid mother to produce two or more daughters, respectively (Fig. 6A) (38). Thus, the vast majority of parasitophorous vacuoles contain 2ⁿ parasites, where *n* indicates the number of parasite divisions resulting in geometric expansion of clonal progeny that eventually leads to host cell rupture (~48 h postinfection by a single parasite) (17). Moreover, tachyzoite endodyogeny consists of a singular three-phase cell cycle composed of major G₁ and S phases with mitosis immediately following DNA replication (Fig. 6A). The G₂ phase is either very short or absent in these parasites (29).

As assessed by immunostaining, the level of H4K20me1 methylation fluctuates from vacuole to vacuole; some contain larger parasites (presumably just before and during mitosis) with heavily decorated nuclei, while others carry slimmer parasites associated with much weaker fluorescence signals (Fig. 6B and D). In contrast, the synchronously replicating parasites within a given vacuole display signals of similar intensities. These data argue for tight regulation of the enzyme and its activity during the tachyzoite cell cycle. As a control, other epigenetic markers, such as the histone H3K4me2 level, were not found to vary during cell cycle progression (data not shown).

We raised several antibodies which, although they specifically recognized recombinant rTgSet8 in vitro, exhibited a weak immunofluorescence signal in vivo (data not shown). Since we could not accurately monitor the turnover of the endogenous protein over the cell cycle, we ended up using the chimeric protein HA-Flag-TgSet8ΔN1 for the following analysis. As to the level of HA-Flag-TgSet8ΔN1 ectopically expressed in tachyzoites, variations between vacuoles and homogeneity within vacuoles were again observed, despite the use of a strong constitutive parasite promoter (*GRA1*, Fig. 1C). This implies that the degradation of the chimeric protein is cell cycle regulated (Fig. 6B). In the same line of results, the endogenous protein TgSet8 followed the same pattern of expression (data not shown). It is unclear if TgSet8 RNA is up-regulated during cell cycle progression, but our results demonstrate that the turnover of the protein is tightly controlled, even when it is ectopically expressed.

Surprisingly, the pronounced increase in H4K20me1 methylation coincides with a decrease in TgSet8ΔN1 protein levels and vice versa (Fig. 6B). To characterize the dynamics of methylation during the cell cycle, we also examined HA-Flag-TgSet8ΔN1 protein levels in a parasite population by flow cytometry analysis (Fig. 6C). While the protein remained relatively constant across the cell cycle, we observed peak intensities associated with the G₁ phase parasite population. To then address whether the H4K20me1 level increases during mitosis and decreases in G₁, we used additional mitosis markers. The phosphorylation of serine 10 on histone H3 is acknowledged as a conserved epigenetic marker of mitosis in organisms ranging from ciliates to mammals (44, 45). With specific anti-H3S10ph antibodies, we showed first that this as-yet-unreported modification exists in *Apicomplexa* and second that it correlates with chromosome condensation during *T. gondii* tachyzoite division. At the end of mitosis, histone H3 is expected to be dephosphorylated, which is consistent with the weakness of the signals observed (Fig. 6D and E; data not shown). Finally, we confirmed that H4K20me1 peaks during mitosis simultaneously with H3S10ph (Fig. 6D; see Fig. S4A in the supplemental material), while TgSet8 is primarily expressed in G₁ and degraded in M phase (Fig. 6E; see Fig. S4B in the supplemental material). Moreover, we noticed that par-

FIG. 7. H4K20 methylation states index heterochromatin in *T. gondii*. (A) Representative view of *Toxoplasma* ChIP-on-chip analysis. High-resolution mapping of both myc-Set8 binding sites and acetylated histone H4 (K5, K8, K12, and K16) locations on chromosome IX. The blue (H4ac) and green (myc-TgSet8) lines plot the median logarithmic ratio ($\log_2 R$) of hybridization intensities in a 500-base window of genomic versus immunoprecipitated DNA. The *x* axis denotes the genomic position of each probe, and the *y* axis shows the normalized log ratio of Cy5 and Cy3 signals, and therefore the signal strength is represented by the height of the rectangle. The data were visualized by the SignalMap software (NimbleGen Systems, Inc.). (B) Close-up view of chromosome IX regions. The horizontal bars represent possible binding regions identified by the SignalMap software. The height of the bar is the signal strength of the probe. Thresholds of 1.3 and 2 were applied to myc-Set8 (yellow) and acetylated histone H4 (blue), respectively. rRNA gene loci are shown in red. Green boxes indicate ToxoDB gene annotations. The data were visualized by the GenoBrowser software. (C) Chromatin from *T. gondii* strain RH::HAMyc-TgSet8ΔN1 was immunoprecipitated with anti-myc, anti-H4K20me1, and anti-H4K20me3 antibodies; immunoprecipitated DNA was analyzed by PCR with specific primers selected in *T. gondii* rRNA gene loci (5S, 17S, and ITS1; see Table S1 in the supplemental material) and the gene for dihydrofolate reductase (DHFR) as a negative control. (D) Detailed view of myc-Set8 (yellow) and H4ac (blue) ChIP-on-chip data at the chromosome XI and Ib telomeric regions. (E to G) DNA obtained by ChIP was analyzed by real-time PCR with repeat-specific primer sets (see Table S1 in the supplemental material). These particular loci were chosen for study because their amplification by real-time PCR gave specific amplicons. Assays were done under conditions in which the product accumulated linearly with respect to the input DNA (see Materials and Methods in the supplemental material). Relative intensity is shown with standard deviations. Chromatin from *T. gondii* strain RH::HAMyc-TgSet8ΔN1 was immunoprecipitated with anti-myc (E), anti-H4K20me1 (F), and anti-H4K20me3 (G) antibodies. (H) Statistical analyses of the HAMyc-TgSet8ΔN1 ChIP signal repartition across chromosomes Ia and Ib (see Materials and Methods in the supplemental material). The enzyme is more frequently enriched in the intergenic region than within gene-rich and promoter-proximal regions. IgG, immunoglobulin G; Chr, chromosome.

asites engaged in cytokinesis still exhibited significant levels of H4K20me1, indicating that the marker is epigenetically transmitted to the daughter cell (Fig. 6F). However, no obvious localization of TgSet8 to mitotic chromosomes was observed (data not shown), which is contrary to what has been described for its human counterpart (31).

H4K20 and H3K9 methylations: a linear pathway for heterochromatin assembly in *T. gondii*. To search for target DNA regions where the TgSet8 protein is associated, we performed a ChIP-on-chip genome-wide analysis with chromatin from tachyzoite cells. We performed a ChIP experiment with a myc antibody and a stable transgenic parasite line expressing HAMyc-TgSet8 Δ N1; we prepared amplicons and applied these amplicons to *T. gondii* full-genome oligonucleotide arrays (NimbleGen Systems, Inc.). Simultaneously, ChIP-on-chip analysis was also performed with antibodies recognizing very abundant chromatin landmarks like acetylated histone residues (e.g., acetylated histone H4 [K5-K8-K12-K16]), which possibly could identify the boundaries of euchromatin domains. We noted that the great majority of HAMyc-TgSet8 Δ N1 binding sites were spaced far from each other (Fig. 7A). However, occasionally there were small chains (typically two or three peaks or chains) of binding sites spaced <1 kb from each other. Importantly, TgSet8 binding sites are prominently localized in hypoacetylated histone H4-enriched regions, suggesting that the enzyme preferentially targets heterochromatin domains (Fig. 7A). Moreover, the enzyme is predominantly enriched within intergenic regions (Fig. 7H; see Fig. S8 in the supplemental material).

First, our ChIP-on-chip data reveal that TgSet8 binds specifically to rRNA gene loci (Fig. 7B). In vertebrates, at the onset of mitosis, the nucleolus disintegrates and rRNA gene transcription ceases. Mitotic silencing of rRNA gene transcription occurs from prophase to telophase. In higher eukaryotes, the rRNA gene copies are clustered and distributed in active and silent nucleolar organizing regions (36). *T. gondii* rRNA gene copies are mono- and trimethylated at H4K20, and concurrently we detected the presence of the enzyme TgSet8 at these loci (Fig. 7B and C). This may explain how the epigenetic state of a given silent rRNA gene is propagated to daughter cells. In higher eukaryotes, the relative amounts of active and silent rRNA genes are maintained independently of transcriptional activity, suggesting that these chromatin states must be maintained throughout the cell cycle and propagated from one cell generation to the next (7).

In addition to rRNA gene loci, TgSet8 binds to several DNA repeats located near the telomeres but also widely dispersed along the *T. gondii* chromosomes such as canonical (TTTAGGG)_n telomeric repeats or satellite DNA such as Sat350 (ABGTg/TGR family) and Sat529a (5) (Fig. 7D). Several high-copy-number repeat elements (up to 800 copies per haploid genome) are located near the telomeres but also along other regions in the largest *Toxoplasma* chromosomes (25, 32, 33).

We then confirmed by quantitative ChIP the distribution of TgSet8—observed by ChIP-on-chip analysis—at four repetitive-DNA-containing loci in a stable transgenic parasite line expressing HAMyc-TgSet8 Δ N1. A robust anti-myc signal seen at these loci suggests that the enzyme methylates histone H4 at these chromosomal addresses (Fig. 7E). Consistent with these results, we found that H4K20me1 and H4K20me3 were both

enriched at the loci whereas no enrichment was detected with the control antibody (Fig. 7F and G, respectively). Unfortunately, no significant enrichment of H4K20me2 was observed (data not shown). Whereas the H4K20me1 and H4K20me3 markers were significantly enriched, the repeats also contained H3K9 methylation as a second heterochromatic signature marker, although we observed a modest enrichment of the marker(s) (see Fig. S5 in the supplemental material). Overall, these studies suggest a functional synergy between the H3K9 and H4K20 methylation systems to establish and propagate apicomplexan heterochromatin and strongly support the idea that this pathway to silent chromatin is not restricted to metazoans, as previously thought.

DISCUSSION

Methyltransferase enzymes are key players in the regulation of chromatin modeling and associated properties, thereby driving numerous essential functions in most cells. In the present report, we characterize these molecules and activities in the large phylum of *Apicomplexa* parasites. These lower eukaryotes have developed a diverse panel of biological stages through their high capacity to differentiate, and epigenetics only begins to emerge as a strong determinant of their biology.

***Apicomplexa* parasites acquired Set8 HTMase homologues.** Whereas metazoans have at least two phylogenetically distinct H4K20 methyltransferases, Suv4-h20 and Set8/PR-Set7, the latter of which is considered an orphan, herein we bring the first evidence that the phylum of apicomplexan parasites harbors a single family of these enzymes phylogenetically and structurally related to Set8. We produced a TgSet8 SET domain model by the homology modeling technique and found that the overall architecture of the family-characterizing SET domain is conserved between *T. gondii* and human Set8 proteins. However, TgSet8 displays the unique feature of mono-, di-, and trimethylase activities, each of which is controlled at the single-amino-acid level. Remarkably, the V1875Y and F1808Y single-amino-acid changes are sufficient to abolish or increase the trimethylase activity, respectively. Additionally, in vivo-observed phenotypes of TgSet8 mutants are fully consistent with our in vitro data; tachyzoites that transiently express the mutant TgSet8 Δ N1(F1808Y) protein no longer display an H4K20me1-associated signal but instead exhibit an increase in the H4K20 trimethyl signal (see Fig. S6A to D in the supplemental material). Such phenotypes also strongly argue that TgSet8 is the specific methylase to target H4-K20 in *T. gondii* cells. However, there are numerous SET domain enzymes in *Apicomplexa* whose histone lysine specificities are uncharacterized. So, we cannot exclude a priori the possibility that one or more of these SET enzymes are H4K20 specific and contribute to the establishment of the K20 methylation patterns observed in vivo. Examination of the fate of the H4K20 marker during differentiation from the rapidly dividing tachyzoite to the quiescent bradyzoite stage might also be informative. Our preliminary data on bradyzoites indicate that H4K20 is highly monomethylated, suggesting that TgSet8 is active in the quiescent cyst as well (see Fig. S7 in the supplemental material).

Set8 plays a pivotal role in heterochromatic histone methylation. While lysine methylations, in particular, H3K4, are widespread in eukaryotes (40), H4K20 methylation has initially

emerged as a marker that preferentially indexes metazoan chromatin. HMTases that target repressive lysine positions (H3K9, H3K27, and H4K20) are absent from *S. cerevisiae*, strongly suggesting that the yeast lacks extensive heterochromatic domains and uses other repressive systems including SIR proteins to silence gene activity (23). It was then proposed that absence of the H4K20 marker could be linked to the more relaxed state of *S. cerevisiae* chromatin. However, the new information brought by the case of *Apicomplexa* parasites calls into question this idea since these parasites harbor H4K20 methylation while displaying a less condensed yeast-type chromatin. It therefore becomes questionable whether the evolution of this epigenetic marker is directly and only linked to the spatial packaging of nucleosomes.

Generally, heterochromatin is formed on highly repetitive satellite DNA in higher eukaryotes (16). In condensed chromosomes, satellite DNA is located in large clusters mostly in heterochromatic regions, near centromeres and telomeres, and sometimes interstitially (19). Metazoan heterochromatin is epigenetically defined by hypoacetylated histones H3 and H4 and methylated H3K9, H3K27, and H4K20. More specifically, H4K20 methylation states are signatures of constitutive heterochromatin that is typically devoid of gene expression (37, 39). We were tempted to speculate that repressive markers, such as histone H4K20 and H3K9 methylations, should also index *Toxoplasma* heterochromatin-embedded repetitive DNA sequences. By using ChIP in a cluster analysis representing *T. gondii* repetitive elements, we showed the selective enrichment of distinct H3K9 and H4K20 methylation markers across satellite DNAs and telomeres and also at rRNA gene loci for H4K20. These chromosomal regions are considered to be repressed, and such a state could be controlled by an H4K20 and H3K9 *trans*-tail histone code that specifically operates on parasite heterochromatin, as is known for mammals (37). Conversely, other repressive systems have been recently discovered to generate and maintain silent chromatin in apicomplexans. For example, a malaria gene homologous to yeast deacetylase Sir2 seems to be required for the establishment of a heterochromatin-like structure at the parasite telomeres, thereby promoting silencing of subtelomeric *var* genes (11, 13). Interestingly, we show that the trimethylated H4K20 epigenetic markers preferentially localize at subtelomeric domains in *P. falciparum* schizonts. Our data thus favor the idea that un- or hypoacetylated histones and methylated H4K20 (and presumably methylated H3K9) epigenetically define *Plasmodium*-silenced chromatin within the telomeres. On the other hand, Artur Scherf's laboratory recently showed that histone H4K16ac is highly enriched at the *var* 5' untranslated region when it is transcriptionally active. And following parasite maturation, that area loses the acetylation marker (J. Lopez-Rubio, A. Gontijo, M. Nunes, R. Hernandez-Rivas, and A. Scherf, Mol. Parasitol. Meet. XVII, abstr. 3E, 2006). Moreover, Chookajorn et al. (4) reported recently that control of *var* gene transcription and antigenic variation is associated with a chromatin memory that includes H3K9me3 as an epigenetic marker. In metazoans, Set8 propagates the silent chromatin to newly synthesized DNA by marking H4K20 according to the map of unacetylated H4K16 on mitotic chromosomes (26, 31). Thus, these two markers could hypothetically negatively interact during parasitic cell cycle progression.

Conclusion. Here we present cumulative evidence that H4K20 is a major marker that exists in lower eukaryotes such as *Apicomplexa* parasites and that it controls, probably in concert with several other histone modification markers, the active or inactive status of the chromatin. In the light of our work and that of others, a central question remains how posttranslational histone modifications, in particular, H4K20 methylation, can regulate cell cycle progression in *Apicomplexa* parasites.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks go to J. C. Rice, G. E. Ward, and W. Bohne for antibodies and S. Yokoyama for vectors. We thank R. Ménard and W. J. Sullivan, Jr., for advice and helpful comments and Laurence Grossi and Karine Musset for technical help. We deeply thank P. Ortet for giving us the opportunity to use the "genome browser" software, which is still unpublished. Preliminary genomic and/or cDNA sequence data were accessed via <http://ToxoDB.org> (22).

M. A. Hakimi is supported by grants from CNRS (ATIP) and INSERM. Bastien Olivier is supported by an FRM fellowship. Genomic data were provided by the Institute for Genomic Research (supported by NIH grant AI05093) and by the Sanger Center (Wellcome Trust). Expressed sequence tags were generated by Washington University (NIH grant 1R01AI045806-01A1).

REFERENCES

1. Aravind, L., and L. M. Iyer. 2003. Provenance of SET-domain histone methyltransferases through duplication of a simple structural unit. *Cell Cycle* 2:369–376.
2. Beisel, C., A. Imhof, J. Greene, E. Kremmer, and F. Sauer. 2002. Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature* 419:857–862.
3. Cheng, X., R. E. Collins, and X. Zhang. 2005. Structural and sequence motifs of protein (histone) methylation enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34:267–294.
4. Chookajorn, T., R. Dzikowski, M. Frank, F. Li, A. Z. Jiwani, D. L. Hartl, and K. W. Deitsch. 2007. Epigenetic memory at malaria virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:899–902.
5. Clemente, M., N. de Miguel, V. V. Lia, M. Matrajt, and S. O. Angel. 2004. Structure analysis of two *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* satellite DNA families and evolution of their common monomeric sequence. *J. Mol. Evol.* 58:557–567.
6. Collins, R. E., M. Tachibana, H. Tamaru, K. M. Smith, D. Jia, X. Zhang, E. U. Selker, Y. Shinkai, and X. Cheng. 2005. In vitro and in vivo analyses of a Phe/Tyr switch controlling product specificity of histone lysine methyltransferases. *J. Biol. Chem.* 280:5563–5570.
7. Conconi, A., R. M. Widmer, T. Koller, and J. M. Sogo. 1989. Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell* 57:753–761.
8. Couture, J. F., E. Collazo, J. S. Brunzelle, and R. C. Trievel. 2005. Structural and functional analysis of SET8, a histone H4 Lys-20 methyltransferase. *Genes Dev.* 19:1455–1465.
9. Dillon, S. C., X. Zhang, R. C. Trievel, and X. Cheng. 2005. The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol.* 6:227.
10. Donald, R. G., D. Carter, B. Ullman, and D. S. Roos. 1996. Insertional tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. Use as a selectable marker for stable transformation. *J. Biol. Chem.* 271:14010–14019.
11. Duraisingh, M. T., T. S. Voss, A. J. Marty, M. F. Duffy, R. T. Good, J. K. Thompson, L. H. Freitas-Junior, A. Scherf, B. S. Crabb, and A. F. Cowman. 2005. Heterochromatin silencing and locus repositioning linked to regulation of virulence genes in *Plasmodium falciparum*. *Cell* 121:13–24.
12. Fang, J., Q. Feng, C. S. Ketel, H. Wang, R. Cao, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. A. Simon, and Y. Zhang. 2002. Purification and functional characterization of SET8, a nucleosomal histone H4-lysine 20-specific methyltransferase. *Curr. Biol.* 12:1086–1099.
13. Freitas-Junior, L. H., R. Hernandez-Rivas, S. A. Ralph, D. Montiel-Condado, O. K. Ruvalcaba-Salazar, A. P. Rojas-Meza, L. Mancio-Silva, R. J. Leal-Silvestre, A. M. Gontijo, S. Shorte, and A. Scherf. 2005. Telomeric heterochromatin propagation and histone acetylation control mutually exclusive expression of antigenic variation genes in malaria parasites. *Cell* 121:25–36.
14. Gouet, P., E. Courcelle, D. I. Stuart, and F. Metoz. 1999. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15:305–308.
15. Hackett, J. D., T. E. Scheetz, H. S. Yoon, M. B. Soares, M. F. Bonaldo, T. L. Casavant, and D. Bhattacharya. 2005. Insights into a dinoflagellate genome through expressed sequence tag analysis. *BMC Genomics* 6:80.

16. Henikoff, S. 2000. Heterochromatin function in complex genomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1470**:O1–8.
17. Hu, K., T. Mann, B. Striepen, C. J. Beckers, D. S. Roos, and J. M. Murray. 2002. Daughter cell assembly in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biol. Cell* **13**:593–606.
18. Jenuwein, T., and C. D. Allis. 2001. Translating the histone code. *Science* **293**:1074–1080.
19. Jones, J. D., and R. B. Flavell. 1983. Chromosomal structure and arrangement of repeated DNA sequences in the telomeric heterochromatin of *Secale cereale* and its relatives. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Cell* **47**(Pt. 2):1209–1213.
20. Julien, E., and W. Herr. 2004. A switch in mitotic histone H4 lysine 20 methylation status is linked to M phase defects upon loss of HCF-1. *Mol. Cell* **14**:713–725.
21. Karachentsev, D., K. Sarma, D. Reinberg, and R. Steward. 2005. PR-Set7-dependent methylation of histone H4 Lys 20 functions in repression of gene expression and is essential for mitosis. *Genes Dev.* **19**:431–435.
22. Kissinger, J. C., B. Gajria, L. Li, I. T. Paulsen, and D. S. Roos. 2003. ToxoDB: accessing the *Toxoplasma gondii* genome. *Nucleic Acids Res.* **31**:234–236.
23. Kurdistani, S. K., and M. Grunstein. 2003. Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**:276–284.
24. Martin, C., and Y. Zhang. 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**:838–849.
25. Matrajt, M., S. O. Angel, V. Pszenny, E. Guarnera, D. S. Roos, and J. C. Garberi. 1999. Arrays of repetitive DNA elements in the largest chromosomes of *Toxoplasma gondii*. *Genome* **42**:265–269.
26. Nishioka, K., J. C. Rice, K. Sarma, H. Erdjument-Bromage, J. Werner, Y. Wang, S. Chuikov, P. Valenzuela, P. Tempst, R. Steward, J. T. Lis, C. D. Allis, and D. Reinberg. 2002. PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol. Cell* **9**:1201–1213.
27. Pradel, E., and J. J. Ewbank. 2004. Genetic models in pathogenesis. *Annu. Rev. Genet.* **38**:347–363.
28. Qian, C., and M. M. Zhou. 2006. SET domain protein lysine methyltransferases: structure, specificity and catalysis. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**:2755–2763.
29. Radke, J. R., B. Striepen, M. N. Guerini, M. E. Jerome, D. S. Roos, and M. W. White. 2001. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **115**:165–175.
30. Rayasam, G. V., O. Wendling, P. O. Angrand, M. Mark, K. Niederreither, L. Song, T. Lerouge, G. L. Hager, P. Chambon, and R. Losson. 2003. NSD1 is essential for early post-implantation development and has a catalytically active SET domain. *EMBO J.* **22**:3153–3163.
31. Rice, J. C., K. Nishioka, K. Sarma, R. Steward, D. Reinberg, and C. D. Allis. 2002. Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes Dev.* **16**:2225–2230.
32. Rocco, L., D. Costagliola, and V. Stingo. 2001. (TTAGGG)_n telomeric sequence in selachian chromosomes. *Heredity* **87**:583–588.
33. Ruiz-Herrera, A., F. Garcia, C. Azzalin, E. Giulotto, J. Egozcue, M. Ponsa, and M. Garcia. 2002. Distribution of intrachromosomal telomeric sequences (ITS) on *Macaca fascicularis* (Primates) chromosomes and their implication for chromosome evolution. *Hum. Genet.* **110**:578–586.
34. Saksouk, N., M. M. Bhatti, S. Kieffer, A. T. Smith, K. Musset, J. Garin, W. J. Sullivan, Jr., M. F. Cesbron-Delauw, and M. A. Hakimi. 2005. Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Cell. Biol.* **25**:10301–10314.
35. Sanders, S. L., M. Portoso, J. Mata, J. Bahler, R. C. Allshire, and T. Kouzarides. 2004. Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* **119**:603–614.
36. Santoro, R. 2005. The silence of the ribosomal RNA genes. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**:2067–2079.
37. Schotta, G., M. Lachner, K. Sarma, A. Ebert, R. Sengupta, G. Reuter, D. Reinberg, and T. Jenuwein. 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* **18**:1251–1262.
38. Sheffield, H. G., and M. L. Melton. 1968. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* **54**:209–226.
39. Sims, J. K., S. I. Houston, T. Magazinnik, and J. C. Rice. 2006. A trans-tail histone code defined by monomethylated H4 Lys-20 and H3 Lys-9 demarcates distinct regions of silent chromatin. *J. Biol. Chem.* **281**:12760–12766.
40. Strahl, B. D., R. Ohba, R. G. Cook, and C. D. Allis. 1999. Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:14967–14972.
41. Sullivan, W. J., Jr., and M. A. Hakimi. 2006. Histone mediated gene activation in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **148**:109–116.
42. Tanaka, Y., M. Tawaramoto-Sasanuma, S. Kawaguchi, T. Ohta, K. Yoda, H. Kurumizaka, and S. Yokoyama. 2004. Expression and purification of recombinant human histones. *Methods* **33**:3–11.
43. Templeton, T. J., L. M. Iyer, V. Anantharaman, S. Enomoto, J. E. Abrahamte, G. M. Subramanian, S. F. Hoffman, M. S. Abrahamsen, and L. Aravind. 2004. Comparative analysis of apicomplexa and genomic diversity in eukaryotes. *Genome Res.* **14**:1686–1695.
44. Van Hooser, A., D. W. Goodrich, C. D. Allis, B. R. Brinkley, and M. A. Mancini. 1998. Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *J. Cell Sci.* **111**(Pt. 23):3497–3506.
45. Wei, Y., C. A. Mizzen, R. G. Cook, M. A. Gorovsky, and C. D. Allis. 1998. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in Tetrahymena. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:7480–7484.
46. Xiao, B., C. Jing, G. Kelly, P. A. Walker, F. W. Muskett, T. A. Frenkiel, S. R. Martin, K. Sarma, D. Reinberg, S. J. Gamblin, and J. R. Wilson. 2005. Specificity and mechanism of the histone methyltransferase Pr-Set7. *Genes Dev.* **19**:1444–1454.
47. Yin, Y., C. Liu, S. N. Tsai, B. Zhou, S. M. Ngai, and G. Zhu. 2005. SET8 recognizes the sequence RHRK20VLRD within the N terminus of histone H4 and mono-methylates lysine 20. *J. Biol. Chem.* **280**:30025–30031.
48. Zhang, X., H. Tamaru, S. I. Khan, J. R. Horton, L. J. Keefe, E. U. Selker, and X. Cheng. 2002. Structure of the *Neurospora* SET domain protein DIM-5, a histone H3 lysine methyltransferase. *Cell* **111**:117–127.
49. Zhang, X., Z. Yang, S. I. Khan, J. R. Horton, H. Tamaru, E. U. Selker, and X. Cheng. 2003. Structural basis for the product specificity of histone lysine methyltransferases. *Mol. Cell* **12**:177–185.

Supplementary Results

Biochemical analysis of TgSet8

Gel filtration chromatography indicate that the enzymatic activity of TgSet8 Δ N1 which is contained within a single polypeptide of ~40 kDa exists as a homodimer, as assessed by the apparent mass of the polypeptide (~80 kDa) (Figure S2A), in line with what has been observed for human Set8 (12). TgSet8 Δ N1 displays a strong HMTase activity toward histone H4 alone or in octamer, but notably, no activity was detected with nucleosomes, unlike to mammalian Set8 (data not shown). Xiao et al. (46) demonstrate that Set8 activity is more sensitive to salt concentration against peptide than nucleosome substrates, supporting the idea that nucleosomes are the pertinent substrate for Set8. We compared the HKMT activities of TgSet8 Δ N1 toward histone H4 substrate at increasing salt concentration. As expected, the trimethylation dropped drastically at physiological salt concentration while the monomethylation is substantially reduced (Figure S2B). The alterations in substrate recognition (i.e., free histone versus nucleosome) along with the salt sensitivity observed for TgSet8 Δ N1 suggest that there must be more extensive contacts between the full-length N-terminal domain of TgSet8 and its physiological substrate *in vivo*.

Using free histone H4 as a substrate, we defined the minimal amino-terminal region required for TgSet8 activity. TgSet8 Δ N4 exhibits no activity even at higher protein concentrations, whereas TgSet8 Δ N1, TgSet8 Δ N2 and TgSet8 Δ N3 proteins display specific HMTase activity (Figures S2C). Additionally, deletion of 7 conserved amino acids from the C-terminus of TgSet8 Δ N1 was enough to prevent the ability of the enzyme to methylate histone H4 (data not shown), suggesting that the N-terminal flanking domain could provide structural stabilization for the SET domain, a property previously reported for mammalian Set8 N-terminal domain (46). Although the contribution of the large N-terminal domain of TgSet8 in this selectivity remains to be determined, our data showed that the minimal active SET domain of TgSet8 spans residues 1590-1893 (e.g. TgSet8 Δ N3) and retains full methylation activity toward free histone H4.

Structural Modeling of TgSet8 Δ N5(1759-1893).

The primary sequences of *Toxoplasma gondii* TgSet8 Δ N5(1759-1893) and *Homo sapiens* HsSet8(Δ 225-352) have been aligned, resulting in 42% strict identity and 75% homology scores, with 7% of gaps, corresponding to 4 insertions in the TgSet8 Δ N5 sequence (Figures 3A and 3B). This strong homology corresponds to the respective catalytic core SET domains that contain both the S-adenosyl-L-methionine (SAM) methyl donor cofactor as well as the histone tail peptide binding sites. Consequently, the HsSet8 catalytic core structure (PDB entry 1zkk, 8) served as a template to generate a TgSet8 Δ N5 3D model using the Modeler program (S14). As expected by the high degree of homology, the overall shape of the TgSet8 core is highly similar to that of the HsSet8 one (Figure 3B). The major differences are located at the N- and C-terminal extremities as well as at the insertion sites; the latter ones being all located at loop or turn positions (Figure 3B). The overall fold of the TgSet8 catalytic domain is composed of a compact ensemble of β -strands grouped in 3 distinct domains, two of them being flanked by one α -helix each. The core also contains at the C-terminus two short helices, the so-called cSET domain, which closes the top of the SAM binding sites (8). The pseudo-knot linker structures, implicated in the substrate bindings, that relate the SET and the cSET domains are virtually identical in the two models. All together these domains create two cavities, one for each cofactor, related by a channel in which the K20 of the H4 peptide enters and gets methylated. Figures 3C describe the lysine-binding pocket of HsSet8 (1zkk, 8) and that of our modeled TgSet8 Δ N5.

ChIP analysis of K9 methylation

Based on the control ChIP, we applied the 1% threshold to evaluate accumulation of distinct K9 methylation marks across the same repetitive elements investigated for K20 methylation (Figure S5). Using this threshold, we observe selective enrichment for monomethylation at Sat529a and telomeric repeat (Figure S5C), and also dimethylation (Figure S5D) and trimethylation (Figure S5E) at chromosome XI- and VI-located repeats. Conversely, H3K9 methylation is barely detectable at the satellite Sat350, which by comparison shows relatively high levels of H4K20 methylation. One plausible explanation is that another typical heterochromatic mark, such as H3K27 (S3), might cross-talk with H4K20 methylations at these loci. But

methylation at K27 was undetectable in the parasite (data not shown) and no *Enhancer of zeste*-related gene has been identified in apicomplexan genomes so far (Figure 1A). An alternate explanation is that the presence of an endogenous protein at the site of methylation (e.g. H3K9) precludes its immunodetection. For instance, the heterochromatin protein 1 (HP1), an essential component of heterochromatin and gene silencing, binds specifically to methylated H3K9 (S1). In *T.gondii* cells, putative HP1 homologs (e.g., *59.m03472*) could sterically hinder the immuno-detection of the modified residue. Consistent with this hypothesis, H3K9 methylation appears severely underrepresented (and can hardly be detected by immunofluorescence, supplemental Figures S5, panels F and G) in bulk histone preparations from tachyzoite cell extracts (supplemental Figure S5A), which instead display robust signals for two H4K20 methylation states (Figure 2A).

Supplementary Experimental Procedures

TgSET8 Δ N5 modeling

The 3D model of TgSET8 Δ N5(1759-1893) domain has been carried out, using the program Modeler version 8v2 (S14) and the HsSET8 structure (PDB entry 1zkk, monomer A, 8) as the template. Several cycles of manual adjustment of the Modeler sequence alignment have been made based on the two model comparisons and the TgSET8 Δ N5 model geometrical parameter evaluations. The TgSET8 Δ N5 final-model quality has been assessed with the Ramachandran diagram using the program PROCHECK (S12): 86.7%, 12.5% and 0.8% residues are respectively in the favoured, allowed and generously allowed regions. No residue has been found into the disallowed region. The superposition of the models have been performed with the SUPERPOSE program (S11) of the CCP4 suite (S4). The highly conserved regions G₁₇₅₉KGR, D₁₇₇₄FVVEY, R₁₈₃₂LINHS and G₁₈₇₀EELLVDYG and H₁₈₈₈PWL (TgSET8 notation, see alignment at Figure 3A) have been provided for the superposition. The TgSET8 model generated shared an average RMS deviation with HsSet8 of 0.5 Å and a 0.7 Å RMS deviation with the DIM-5 catalytic core (PDB entry 1PEG).

Phylogenetic analysis of SET domain-containing proteins

The 111 domain-SET sequences were identified by a blastp analysis using the *Swissprot* database. The sampled SET domain-containing proteins were aligned using ClustalW software (S16). Multiple sequence alignments were computed with the HMMER package v2.3.2 (S6) and the Pfam PF00856 family hmmer profil (S7), followed by manual refinement with Jalview (S5). Neighbor-joining tree was computed using the ClustalX software (S16).

Construction of *T. gondii* and *E. coli* expression vectors

The coding sequence of TgSet8ΔN1 (residue1529-1893) was first amplified by RT-PCR using total RNA (RH strain). PCR products (oligonucleotides in supplemental Table 1) were cloned into the bacterial expression vectors pET28a+ (Novagen) to create pCS68 (His₆-TgSet8ΔN1), the pMAH14 and pNS85 vectors to create respectively pCS73 (HAFlag-TgSet8ΔN1) and pCS102 (HAMyc-TgSet8ΔN1). The vectors pMAH14 and pNS85 are used to express ectopically epitope-tagged protein under the control of a constitutive and strong promoter (GRA1, Figure 1C). cDNAs corresponding to TgSet8ΔN2 (residue1544-1893), TgSet8ΔN3 (residue1590-1893), TgSet8ΔN4 (residue1672-1893) were produced by PCR using specific oligonucleotides (supplemental Table 1). cDNAs corresponding to mutated TgSet8ΔN1 (V1875Y) and TgSet8ΔN1 (F1808Y) were produced by PCR recombination (S9) using four different oligonucleotides for each of the constructs (supplemental Table 1) and subcloned in pET28a+ and pMAH14.

Expression in *E. coli* of recombinant proteins

Expression plasmids (pET28a) were amplified in *E. coli* BL21 (DE3). After induction of protein expression with isopropyl β-D-thiogalactopyranoside, the His fusion proteins were recovered as inclusion bodies. After solubilization in lysis buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 6 M urea, 5% glycerol), the fusion proteins were purified on Ni²⁺-NTA columns according to the supplier's protocol (Qiagen). After elution with 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 6 M urea, 5% glycerol and 300 mM imidazole, the proteins were renatured by dialysis overnight against 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 250 mM KCl, 0,5 mM dithiothreitol, 10% glycerol and stored at -80°C until use. The purity of each protein preparation was checked by SDS-

polyacrylamide gel electrophoresis followed by Coomassie Blue staining of the protein. We also confirmed that each bacterially expressed protein was not aggregated.

Flow cytometry analysis

Filter-purified intracellular tachyzoites were fixed in 8% formaldehyde, 1% methanol, pelleted at 2,500 rpm and resuspend in phosphate buffered saline (PBS). Parasites were stained with an anti-toxoplasma antibody to discriminate, parasites and cells debris. They were then stained using 10 $\mu\text{g/ml}$ PI (propidium iodide) and 50 $\mu\text{g/ml}$ RnaseA, before incubation in the dark at room temperature for 30 min. Nuclear DNA content was measured based on PI fluorescence using a 488 nm argon laser and a Becton-Dickinson FACS Calibur flow cytometer (Becton-Dickinson Inc., San Jose, CA). Fluorescence was collected in linear mode (10,000 events) and the results were quantified using CELLQuest™ v3.0 (Becton-Dickinson Inc.). The percentages of G1 (1 N), S (1–2 N) and G2+M (2 N) tachyzoites were calculated based on defined gates for each population.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay

ChIP was performed as described previously (34). Immuno-precipitated DNA were purified through PCR Purification Kit columns (QIAGEN) and used as a template in semiquantitative QPCRs to detect specific targets. Specific primer pairs (melting temperature, 55 to 65°C) amplifying 200- to 450-bp fragments were used (supplemental Table 1). PCR was performed with 1 μL of DNA and 500 nM primers diluted to a final volume of 20 μL in SYBR Green Reaction Mix (Roche). Accumulation of fluorescent products was monitored by real-time PCR using a LightCycler 2.0 (Roche). Each PCR reaction generated only the expected specific amplicon, as shown by the melting-temperature profiles of final products (dissociation curve, automatically measured by the LightCycler 2.0) and by gel electrophoresis of test PCR reactions. No PCR products were observed in the absence of template. The fold difference of a given target sequence precipitated by a specific antibody was determined by dividing the amount of target sequence in the immunoprecipitate fraction by the amount of target sequence in input DNA (S8, S13). Real-time PCR was carried out in triplicate on 2 ng of DNA at 50°C for 2 min

and 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Data were collected at 60°C. The concentration of primers and Taqman probes used was determined by following the optimization procedure described in PE Applied Biosystem's protocol. For each experiment, the threshold was set to cross a point at which real-time PCR amplification was linear. For the majority of the experiments, data were analyzed with a threshold of 0.05. Data collected was analyzed and plotted using Microsoft Excel.

ChIP-on-Chip Analysis

The generation of amplicons from the individual ChIP DNA sample was performed according to the manufactures' protocol (*NimbleGen*) and as described previously (S2, S15, S18). In brief, sample DNA was blunted with T4 DNA polymerase (New England Biolabs) and ligated to the linker oligonucleotides (oligo-1: 50-GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC-30, oligo-2: 50-GAATTCAGATC-30) by means of T4 DNA ligase (*New England Biolabs*). Linker-ligated samples were amplified by PCR with oligo-1 probe as a primer, and PCR products were purified by Quiaquick PCR purification kit (*QIAGEN*). Oligonucleotide array analysis was performed by NimbleGen Systems as a part of a Chromatin Immunoprecipitation Array Service (*NimbleGen*). We used custom synthetic tiling microarrays. Two NimbleGen arrays (387,000 features per array, 46~50mer oligos) that cover the whole *T. gondii* genome (ToxoDB.org) were hybridized with genomic DNA and either myc-TgSet8- or acetylated H4 (K5, K8, K12, K16)-bound DNA from a chromatin immunoprecipitation. Probes on the array were spaced at a density of 1 probe per 50 bp. Data represent the average of two biological replicates. In a typical two-color ChIP-chip experiment, two different populations of DNA are labeled with distinct fluorophores and cohybridized to arrays. One population corresponds to enriched genomic fragments captured by ChIP. The other population corresponds to total genomic DNA and serves as a reference for hybridization. To normalize array data, the log₂ of the ratio of Cy5 (Myc-TgSet8 ChIP amplicons) to Cy3 (Total DNA amplicons) for each point was calculated. Then, the biweight mean of this log₂ ratio was subtracted from each point; this procedure is approximately equivalent to mean-normalization of each channel. For our peak detection method, we use a percentile for each array (95th and 98th percentile) of log₂ oligomer ratios as described (S2, S15, S18). A histogram that displays log₂ measurement ratios (ChIP-enriched DNA/total

genomic DNA) was visualized by the SignalMap software (*NimbleGen Inc.*) and by *Genobrowser*. Each bar represents a probe. The left and right boundary of the bar represent the genomic starting and ending position of the probe, respectively. The height of the bar is the signal strength of the probe.

Statistical analyses of TgSET8 ChIP signal repartition across the genome.

Statistical analyses of the ChIP signal repartition were performed with the R package software (S10). The chromosomal regions were clustered into three main DNA sequences: the CoDing Sequence or CDS (specified here as ‘gene’), the Proximal region (2000-bp upstream and downstream of each CDS) and the intergenic region. The enrichment within these three regions (‘observed proportion’) were compared to what should be expected if signal have an uniform repartition (‘theoretical proportion’). The test is a classical Proportion test (S17). For each chromosome, we

computed the following formula:
$$z = \frac{P - PC}{\sqrt{\frac{PC(1 - PC)}{NC}}}$$
 where C is the chromosome size,

L is the region size, NC is the number of signal in the chromosome, NL is the number of signal in the region, PC is the theoretical proportion and P is the observed Proportion. The computed value is assumed to follow the standard Normal Distribution $N(0,1)$ when the two conditions $CV1 = NC*PC$, $CV2 = NC*(1-PC)$ are at least equal to 5. When this is the case, the value $|z|=1.96$ have a probability of 0.05 to be exceeded.

Conventional and affinity chromatographies

Two grams of whole cell extract (WCE) from extracellular tachyzoites (RH strain) were loaded on a 250 ml column of phosphocellulose (P11, Whatman) and fractionated stepwise by the indicated KCl concentrations in buffer A (20 mM Tris.HCl, pH 7.9, 0.2 mM EDTA, 10 mM β ME, 10% glycerol, 0.2 mM PMSF). The P11 0.3 M, 0.5 and 1M KCl fractions were loaded sequentially on histone H4 tail affinity resin column. Beads were washed extensively with 20 CV of BC500 buffer (20 mM Tris [pH 8], 0.5 M KCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 1mM DTT, 0.1% NP40, 0.5 mM PMSF, aprotinin, leupeptide, pepstatin, 1 μ g/ml each) and eluted with glycine (pH 2.5, 100 mM). Fractions were analyzed by Western blotting.

Mass spectrometry analysis

Methylations reactions were performed as described previously. Modified rH4 histone is separated from rTgSET8ΔN1 enzyme by SDS page using 4-20% gradient. The rH4 corresponding gel band cut from the gel is washed successively by acetonitrile-ammonium bicarbonate 25 mM (1/1), water and finally with pure acetonitrile. In gel digestion on H4 is performed overnight using Endoproteinase Asp-N sequencing grade from *Pseudomonas fragi* mutant (Roche) on 50 mM Sodium Phosphate pH 8 at 37 °C and at an approximate ratio of enzyme/substrat of 1/20. 25 μ l of enzyme, in the appropriate concentration, is first added on the dried band followed 30 min. later by 30 μ l of buffer. Digested peptides are recovered from the gels by a serie of extractions (acetonitrile 50 %, Formic acid 5 % and pure acetonitrile). All extracts are *gather* and dried. The digest is retaken by 3 μ l of TFA (trifluoroacetic acid) 5 % and diluted with 30 μ l of 2% acetonitrile-0.2 formic acid for LC/MS-MS analysis on a CapLC (Waters) coupled to a Q-TOF mass spectrometer (Waters). The analysis are performed in the same conditions as the one used for protein identification (34).

Supplementary References

1. Bannister, A. J., P. Zegerman, J. F. Partridge, E. A. Miska, J. O. Thomas, R. C. Allshire, and T. Kouzarides. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**: 120-124.
2. Bieda, M., X. Xu, M. A. Singer, R. Green, and P. J. Farnham. 2006. Unbiased location analysis of E2F1-binding sites suggests a widespread role for E2F1 in the human genome. *Genome Res* **16**: 595-605.
3. Cao, R., and Y. Zhang. 2004. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 155-164.
4. CCP4 Collaborative Computational Project, Number 4. 1994. The CCP4 Suite Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst D* **50**: 760-763.
5. Clamp, M., J. Cuff, S. M. Searle, and G. J. Barton. 2004. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* **20**: 426-427.
6. Eddy, S. R. 1998. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* **14**: 755-763.
7. Finn, R. D., J. Mistry, B. Schuster-Bockler, S. Griffiths-Jones, V. Hollich, T. Lassmann, S. Moxon, M. Marshall, A. Khanna, R. Durbin, S. R. Eddy, E. L.

- Sonnhammer, and A. Bateman. 2006. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res* **34**: D247-251.
8. Frank, S. R., M. Schroeder, P. Fernandez, S. Taubert, and B. Amati. 2001. Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes Dev* **15**: 2069-2082.
 9. Hakimi, M. A., I. Privat, J. G. Valay, and S. Lerbs-Mache. 2000. Evolutionary conservation of C-terminal domains of primary sigma(70)-type transcription factors between plants and bacteria. *J Biol Chem* **275**: 9215-9221.
 10. Ihaka, R., and R. Gentleman. 1996. R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* **5**: 299-314.
 11. Krissinel, E., and K. Henrick. 2004. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 2256-2268.
 12. Laskowski, R. A., M. W. McArthur, D. S. Moss, and J. M. Thornton. 1993. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst* **26**: 283-291.
 13. Litt, M. D., M. Simpson, F. Recillas-Targa, M. N. Prioleau, and G Felsenfeld. 2001. Transitions in histone acetylation reveal boundaries of three separately regulated neighboring loci. *Embo J* **20**: 2224-2235.
 14. Marti-Renom, M. A., R. H. Stote, E. Querol, F. X. Aviles, and M. Karplus. 2000. Structures of scrambled disulfide forms of the potato carboxypeptidase inhibitor predicted by molecular dynamics simulations with constraints. *Proteins* **40**: 482-493.
 15. Squazzo, S. L., H. O'Geen, V. M. Komashko, S. R. Krig, V. X. Jin, S. W. Jang, R. Margueron, D. Reinberg, R. Green, P. J. Farnham. 2006. Suz12 binds to silenced regions of the genome in a cell-type-specific manner. *Genome research* **16**: 890-900.
 16. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**: 4876-4882.
 17. Valleron, A. J. 1998. *Introduction à la Biostatistique*. Masson Edition, Paris.

18. Yamashita, M., K. Hirahara, R. Shinnakasu, H. Hosokawa, S. Norikane, M. Y. Kimura, A. Hasegawa, and T. Nakayama. 2006. Crucial role of MLL for the maintenance of memory T helper type 2 cell responses. *Immunity* **24**: 611-622.

Supplementary LEGEND

Figure S1. Domain-SET phylogenetic tree. The unrooted phylogenetic tree was inferred from the SET domain alignment. All tree leaf labels give for each sequence the organism name, the accession number and entry name of the sequence in the Swissprot database, except for the *Toxoplasma gondii* sequences (TOXODB.org). The tree was computed with the neighbor-join algorithm, based on an HMM multiple alignment (S6).

Figure S2. Methylation assays with TgSet8 derivatives. (A) HMTase assays with TgSet8 Δ N1 and (His)₆-H4 substrate in the presence of increasing concentrations of NaCl were analyzed by Western blotting. (B) Four TgSet8 derivatives were compared for their specific HMTase activities using equal amounts of free histone (His)₆-H4. Bottom panel shows coomassie staining of recombinant enzymes.

Figure S3. H4K20me1 and H4K20me3 staining of apicomplexan heterochromatin. (A) Co-staining with anti-H4K20me1 (*green*) and Hoechst 33258 (*blue*) of human fibroblast cells infected with *Neospora caninum* strain (tachyzoite). (B) Nuclear areas marked by H4-H4K20me1 are shown at a higher magnification. (C) Co-staining with anti-H4K20me3 (*green*) and Hoechst 33258 (*blue*) of human fibroblast cells infected with *Neospora caninum* strain (tachyzoite). (D) Nuclear areas marked by trimethyl H4-H4K20me3 are shown at a higher magnification. The cross-reactions at the apical end of *Neospora caninum* cells is frequently observed with antibodies raised against any trimethylated lysine residue. (E) *T.gondii* tachyzoite cells co-stained with anti-H4K20me3 (*green*) and anti-IMC1 (*red*) were analyzed by confocal microscopy. (F) Electron microscopy of a longitudinal section of *T.gondii* tachyzoite cells. (G) Schizont stage *Plasmodium falciparum* parasites (3D7 strain) were co-stained with anti-H4ac (*green*) and Hoechst 33258 for DNA staining (*blue*).

Figure S4. The H4K20me1 mark is cell cycle regulated. (A) Co-staining with anti-H3S10ph (*red*), anti-H4K20me1 (*green*) and Hoechst 33258 (*blue*) of human

fibroblast cells infected with *T.gondii* RH strain. (B) Co-staining with anti-H3S10ph (*red*), anti-HA (*green*) and Hoechst 33258 (*blue*) of human fibroblast cells infected with transgenic *T.gondii* strain RH::HAFlag-TgSet8.

Figure S5. Histone H3K9 methylations in *T.gondii*. (A) Histones were extracted from the indicated organisms, fractionated by SDS-PAGE and blotted with antibodies against α -H3K9me1, α -H3K9me2, and α -H3K9me3. (B) Schematic representation TgSet3, a Suv3-9 homolog (55.m04640, TOXODB.org). The preSET, SET and post-SET domains are indicated. (C-E) ChIP precipitated DNA was analysed by real-time PCR with the repeat-specific primer sets (supplementary Table 1). Assays were done under conditions in which product accumulated linearly with respect to input DNA as described in Methods section. The relative intensity is shown with standard deviations. Chromatin from *T.gondii* RH::HAMyc-TgSet8 Δ N1 strain was immunoprecipitated with anti-H3K9me1 (C), anti-H3K9me2 (D), and anti-H3K9me3 (E). (F) Co-staining with anti-H3K9me1 (*green*) and anti-IMC1 (*red*) of human fibroblast cells infected with *T.gondii* RH strain. (G) Co-staining with anti-H3K9me2 (*green*) and anti-IMC1 (*red*) of human fibroblast cells infected with *T.gondii* RH strain.

Figure S6. Transient expression of the F1808Y mutation in *T.gondii*. Co-staining with either anti-H4K20me1 (C and D) or anti-H4K20me3 (A and B) (*green*) and anti-HA (*red*) of human fibroblast cells infected with a population of *T.gondii* strain RH transiently transfected with a HAFlag-TgSet8 Δ N1(F1808Y) construct. Ectopic expression of the chimeric protein (HA positive cells) interferes with the endogenous enzyme activity by enhancing drastically the trimethylation of histone H4 (B). In addition, hyper-trimethylation of H4K20 counteract the monomethylation activity within the transfected cells as observed *in vitro* (A).

Figure S7. H4K20me1 marks chromatin of *T.gondii* bradyzoite. (A) Bradyzoite-containing cyst (*T.gondii* Prugniaud strain) purified on percoll from mouse brain were co-stained with anti-H4K20me1 (*green*), an anti-CC2 which recognized the cyst membrane (*red*) and Hoechst 33258 (*blue*). (B) Histological labeling of bradyzoite-containing cyst were co-stained with anti-H4K20me1 (*green*), anti-CC2 (*red*) and Hoechst 33258 (*blue*).

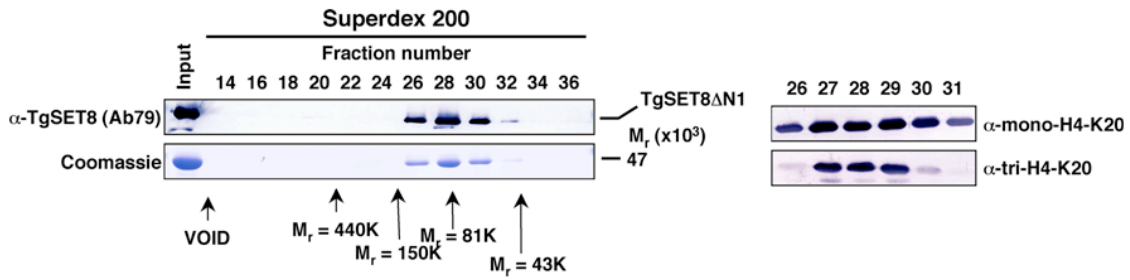
Figure S8. Statistical analyses of the HAMyc-TgSet8DN1 ChIP signal repartition across the 14 *Toxoplasma gondii* chromosomes
(See supplemental materials and methods).

Figure S1

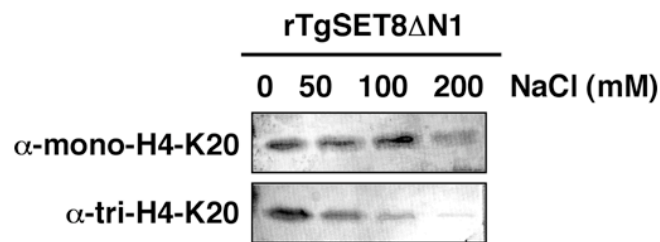


Figure S2

A



B



C

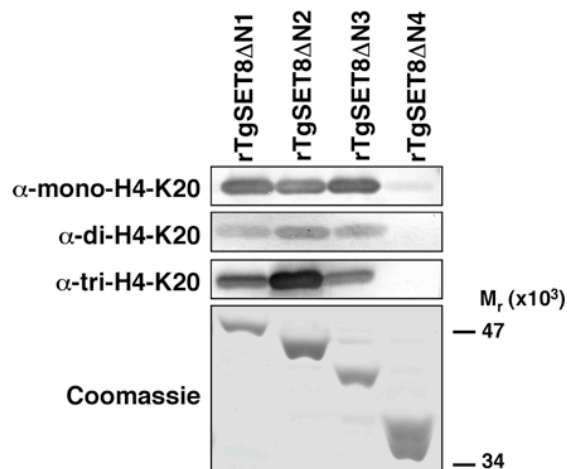
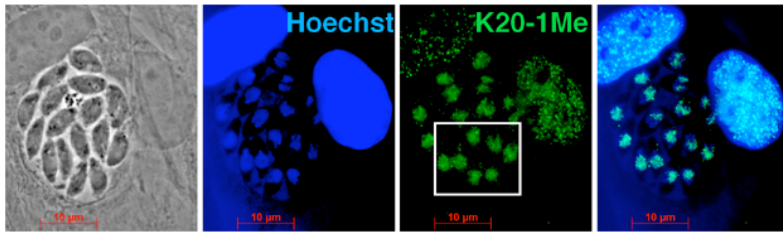
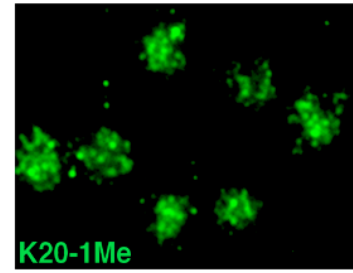


Figure S3

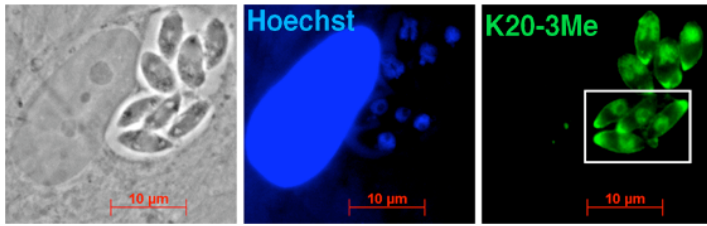
A



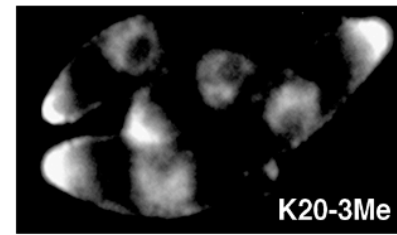
B



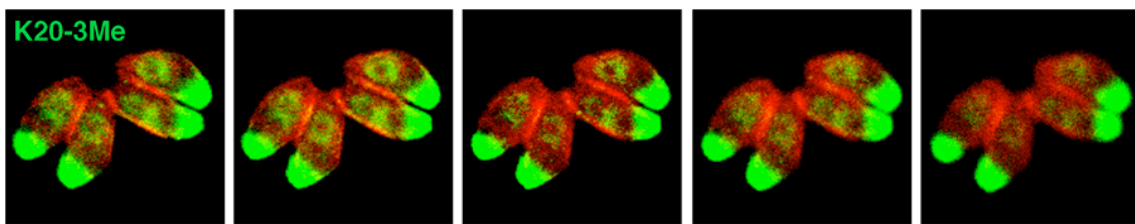
C



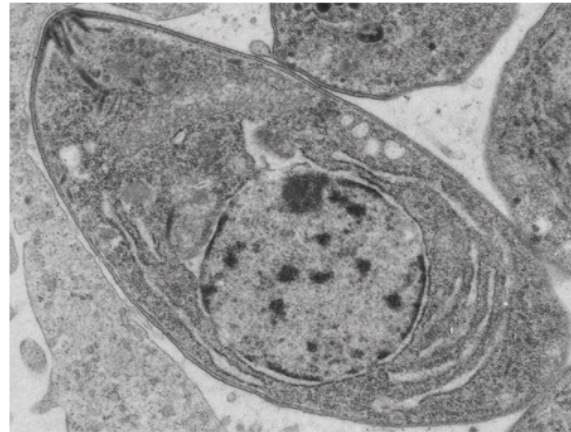
D



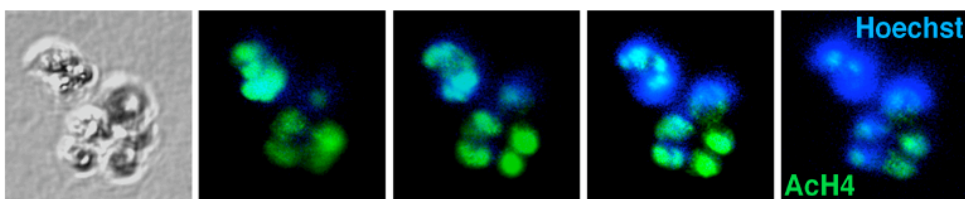
E



F



G



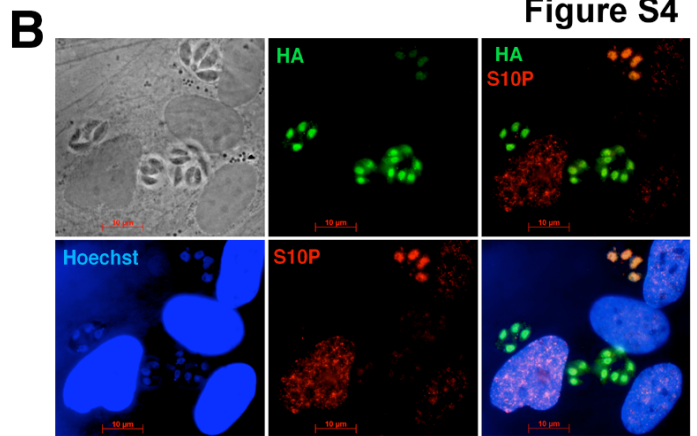
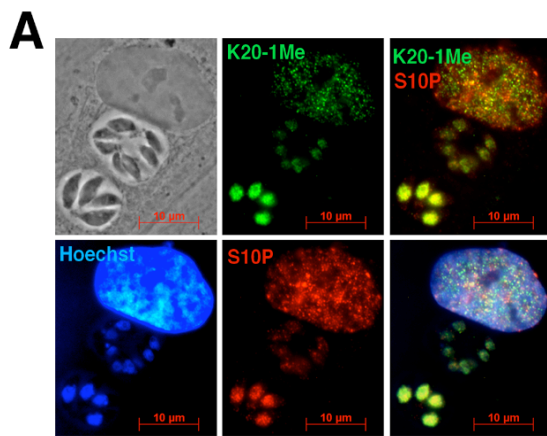
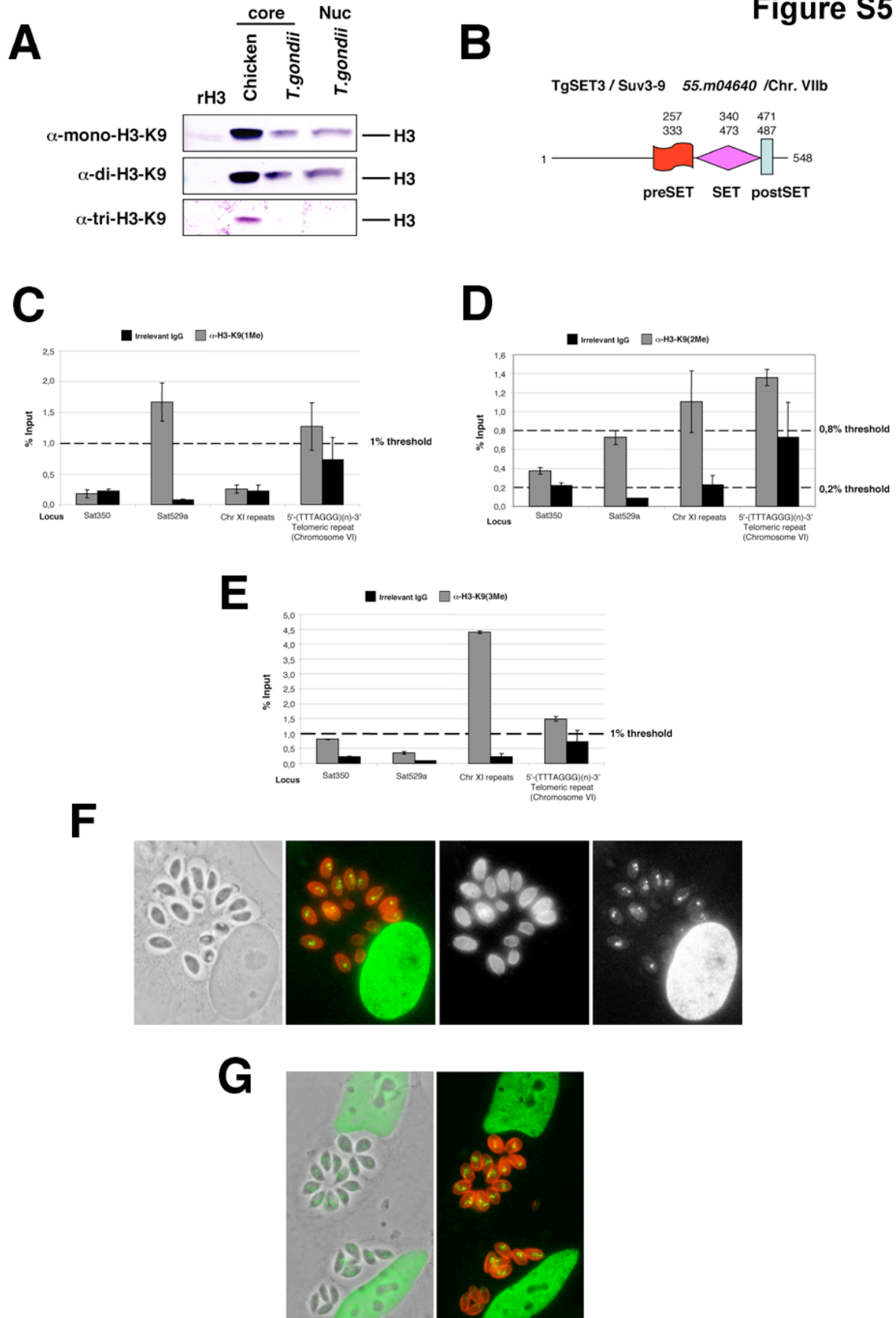
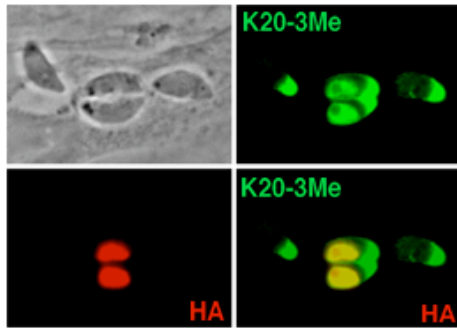
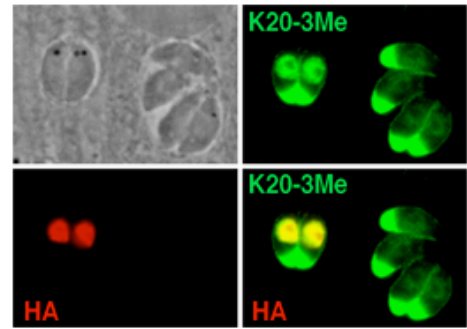
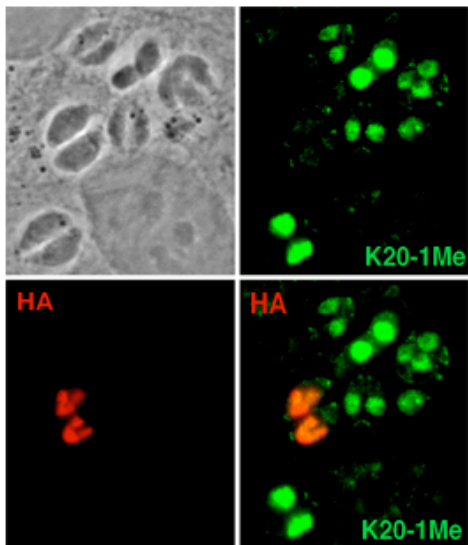
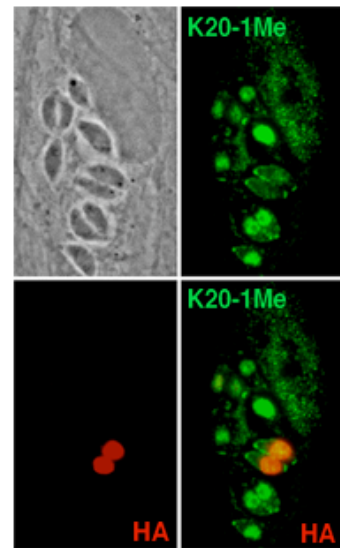


Figure S5



A**B****Figure S6****C****D**

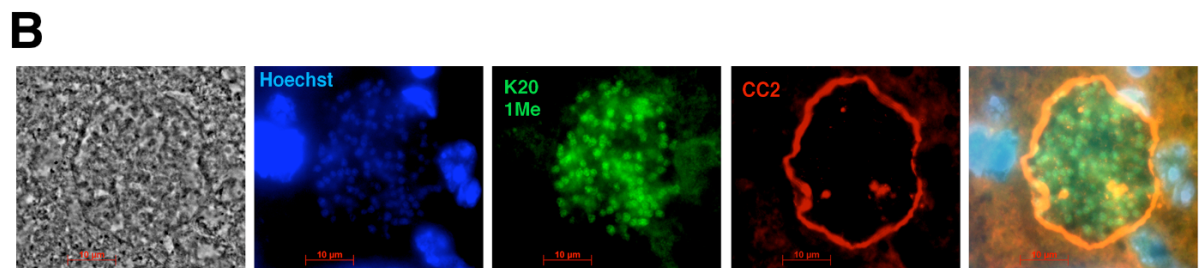
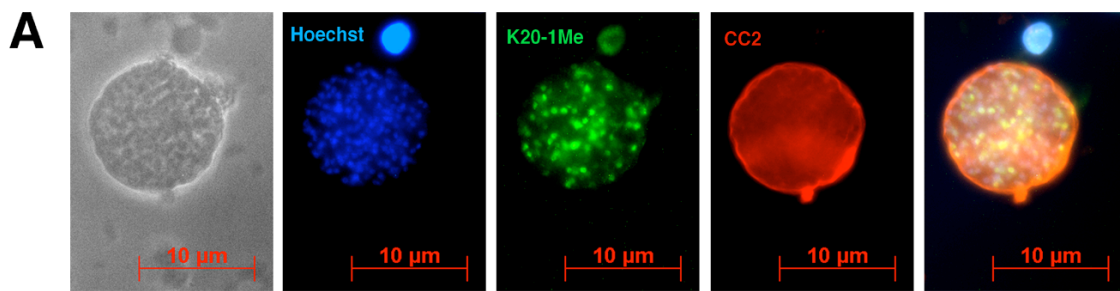
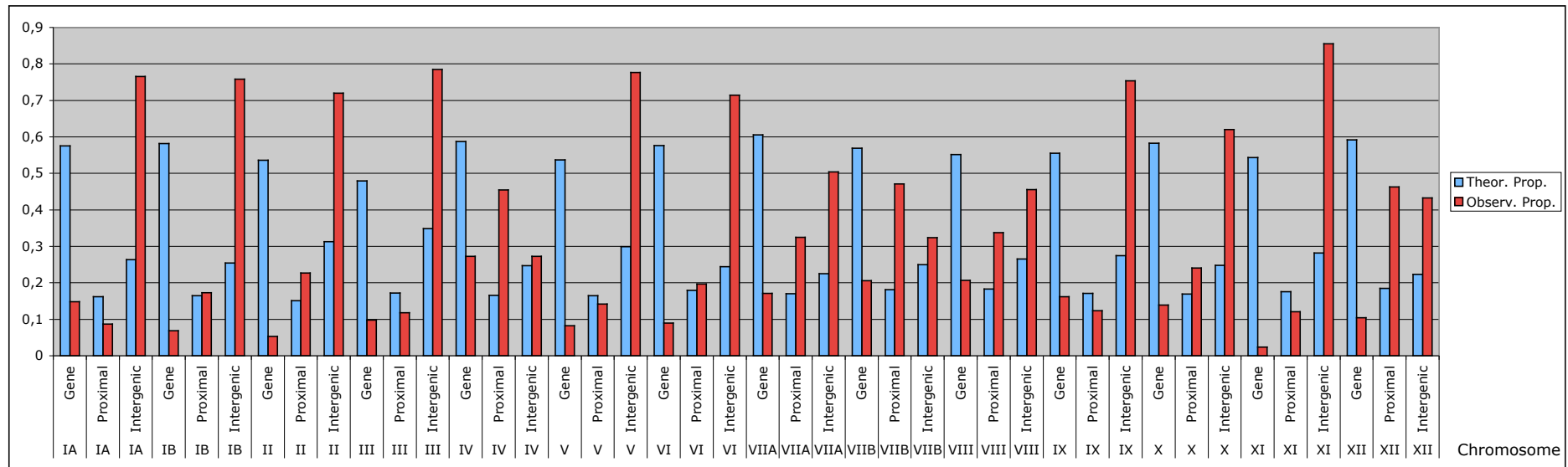


Figure S7

Figure S8



	Primer 5'	Sequence Primer 5'	Primer 3'	Sequence Primer 3'
TgSet8ΔN1	OL1 TgSET12-AQY-PCR5-BamHI	ggatccGCCAGTACGCGCCGAACCTCTTTTG	OL2 TgSET12-STOP-PCR3-HindIII	AAGCTTcgaaaacgagccTCAGCTGTTT
TgSet8ΔN2	OL3 TgSET12-RGN-BamHI	ggatccCGAGGCAACAAGGACATCGAC	OL4 pET28a-PCR3	CGGATATAGTTCCTCCTTTTTCAGCAAAAAAC
TgSet8ΔN3	OL5 TgSET12-ASR-BamHI	ggatccGCCTCGCGACGAACTGGGGAG	OL6 pET28a-PCR3	CGGATATAGTTCCTCCTTTTTCAGCAAAAAAC
TgSet8ΔN4	OL7 TgSET12-EEK-BamHI	ggatccGAAGAGAAGGCACAACGGATG	OL8 pET28a-PCR3	CGGATATAGTTCCTCCTTTTTCAGCAAAAAAC
TgSet8ΔN1 (V1875Y)	OL9 Mutant 7 V336Y-PCR5	GAGGAGCTGCTGtacGACTACGGCGAGCGT	OL10 Mutant 7 V336Y-PCR3	ACGCTCGCCGTAGTCgtaCAGCAGCTCCTC
TgSet8ΔN1 (F1808Y)	OL11 Mutant 8 F273Y-PCR5	AGCTTCATGTaCTACTTCAAAAACGGGTCT	OL12 Mutant 8 F273Y-PCR3	AGACCCGTTTTTGAAGTAGtACATGAAGCT
TgSet8ΔN1 (ΔC-7aa)	OL13 TgSET12-AQY-PCR5-BamHI	ggatccGCCAGTACGCGCCGAACCTCTTTTG	OL14 mutant 10-delta-EHP-PCR3	aagcttCTaTTTTGATAACGTCCGGATCACG
Région chromosomique VI	OL15 TELOMERIC-ChrVI-PCR5	CAGGGTGCATGCCCGGAACCTTGCCTC	OL16 Telomerique-repeat-PCR3	CTAAACCCTAAACCCTAAACCCTAAAC
Répétition 350B	OL17 TgSAT350-1 B-PCR5	CRACTCGGACGTCAGGCCATGCAGAG	OL18 TgSAT350-1 B-PCR3	GCGCCTGAACAATACGCCCAACC
Répétition 529A	OL19 529-bp repeat-A-PCR5	CTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG	OL20 529-bp repeat-A-PCR3	CTGCAGACACAGTGCATCTGGATT
Région télomérique 995285	OL21 995285repeat-PCR5	GTCTCCCGCTTTTCGGCCTCATCTCCAG	OL22 995285repeat-PCR3	CTGTAAATCGCCTCTGAGCCTGTCC
5S rDNA primers	OL23 5S-PCR5	TGAACACAACCTCGCTTTTGC	OL24 5S-PCR3	GTCTGAAGGGATCCGGTGTGA
17S rDNA primers	OL25 17S-PCR5	ACAATTGGAGGGCAAGTCTG	OL26 17S-PCR3	CTGCAGTATTCAAGGCGACA
ITS1 rDNA primers	OL27 ITS1-PCR5	TTTGCAATCAAGAAGCGTGA	OL28 ITS1-PCR3	GCACATCGAGAGAGATGCAG

Supplemental TABLE 1

Primary antibodies	IFA	IHC	Western	ChIP
Monoclonal anti-hemagglutinin epitope tag (HA) (Roche Diagnostic)	1/1,000			
Polyclonal anti-hemagglutinin epitope tag (HA) (rabbit antiserum, Eurogentec)	1/1,000			
Monoclonal anti-Myc (9E10 - sc40X, Santa-Cruz Bio.)				Yes
Monoclonal anti-IMC1 (gift from Dr. Ward GE)	1/2,000			
Monoclonal anti-CC2 (gift from Gross U.)		1/1,000		
Polyclonal anti-H4-K20-1me (Abcam ab9051)	1/500	1/250		Yes
Polyclonal anti-H4-K20-2me (Abcam ab9052)	1/500		1/1,000	Yes
Polyclonal anti-H4-K20-3me (Abcam ab9053)	1/1,000	1/500		Yes
Polyclonal anti-H4-K20-1me (gift from Rice JC,Sims et al., 2006)			1/150,000	Yes
Polyclonal anti-H4-K20-2me (gift from Rice JC,Sims et al., 2006)			1/100,000	Yes
Monoclonal anti-H3S10P (Abcam ab14955)	1/500			
Polyclonal anti-H4 Acetylated (K5-K8-K12-K16) (upstate 06-866)	1/1,000			
Anti-H3-K9-1me (upstate 07-450)	1/250		1/1,000	Yes
Anti-H3-K9-2me (upstate 07-441)	1/250		1/1,000	Yes
Anti-H3-K9-3me (upstate 07-442)	1/250		1/1,000	Yes
Polyclonal anti-Histone H4 unmodified (Abcam ab4559)			1/1,000	
Polyclonal anti-TgSET8 (79) (rabbit antiserum, Eurogentec)	1/500		1/1,000	

Supplemental TABLE 2

The histone methylase KMTox interacts with the redox-sensor peroxiredoxin-1 and targets genes involved in *Toxoplasma gondii* antioxidant defences

Céline F. Sautel,^{1,2‡} Philippe Ortet,^{3‡}
Nehmé Saksouk,^{1,2†} Sylvie Kieffer,⁴ Jérôme Garin,⁴
Olivier Bastien⁵ and Mohamed-Ali Hakimi^{1,2*}

¹Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Micro-organismes, Université Joseph Fourier GRENoble 1, BP 170, F-38042 Grenoble cedex 9, France.

²CNRS UMR 5163 – ATIP+ group, Grenoble, France.

³CEA, DSV, IBEB, LEMiRE, CNRS, Université Aix-Marseille II, CEA Cadarache, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France.

⁴Inserm Erit – M 0201, CEA, Grenoble, France.

⁵UMR 5168 CNRS-CEA-INRA- Joseph Fourier University; CEA Grenoble, France.

Summary

The ability of living cells to alter their gene expression patterns in response to environmental changes is essential for viability. Oxidative stress represents a common threat for all aerobic life. In normally growing cells, in which hydrogen peroxide generation is transient or pulsed, the antioxidant systems efficiently control its concentration. Intracellular parasites must also protect themselves against the oxidative burst imposed by the host. In this work, we have investigated the role of KMTox, a new histone lysine methyltransferase, in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. KMTox is a nuclear protein that holds a High Mobility Group domain, which is thought to recognize bent DNA. The enzyme methylates both histones H4 and H2A *in vitro* with a great preference for the substrate in reduced conditions. Importantly, KMTox interacts specifically with the typical 2-cys peroxiredoxin-1 and the binding is to some extent enhanced upon oxidation. It appears that the cellular functions that are primarily regulated

by the KMTox are antioxidant defences and maintenance of cellular homeostasis. KMTox may regulate gene expression in *T. gondii* by providing the rapid re-arrangement of chromatin domains and by interacting with the redox-sensor TgPrx1 contribute to establish the antioxidant 'firewall' in *T. gondii*.

Introduction

Stress-inducible defence or adaptive response mechanisms act to protect cells from the increased levels of reactive oxygen species (ROS) produced from metabolic events, such as respiration or fatty acid oxidation, or due to environmental processes. Both prokaryotic and eukaryotic cells respond to oxidative stress. The initial effects are the activation of defence mechanisms that lead to co-ordinated activation of a battery of defensive genes required for the detoxification of reactive molecules as well as for the maintenance of cellular homeostasis. An increase in oxidants can trigger alterations in transcription through a number of distinct mechanisms. Bacteria use transcription factors (e.g. OxyR or SoxRS) to sense the redox state of the cell and to respond to the signal by increasing the expression of defence activities (Zheng and Storz, 2000). In *Saccharomyces cerevisiae* the transcription factor Yap1 rapidly redistributes to the nucleus upon activation by ROS where it regulates the expression of up to 70 genes (Kuge *et al.*, 1997; Godon *et al.*, 1998). In mammalian cells, the transcription factor Nrf2 controls the expression of antioxidant proteins and enzymes involved in the detoxification of harmful compounds (Jaiswal, 2004). Finally, an alteration in ROS levels can be reflected in a change of intracellular redox buffer that, in turn, modulates the activity of chromatin-modifying enzymes such as the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIR2 (Fulco *et al.*, 2003).

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite invading a broad range of host cells including immune cells. While ROS can kill *T. gondii in vitro* the role these molecules play *in vivo* is still controversial. Cells of the immune system use the damaging effects of ROS to eliminate invading pathogens. As expected, *T. gondii* proliferation *in vivo* is most certainly dependent on the

Accepted 22 October, 2008. *For correspondence. E-mail Mohamed-Ali.Hakimi@ujf-grenoble.fr; Tel. (+33) 4 76 63 74 69; Fax (+33) 4 76 63 74 97. †Present address: Laval University Cancer Research Center, Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ), Québec, Canada. ‡These authors contributed equally to this project.

absence or suppression of the respiratory burst. Several reports indicate that the parasite is well armed to neutralize endogenously generated ROS (Miller and Britigan, 1997; Henkle-Dührsen and Kampkötter, 2001; Ding *et al.*, 2004). The parasite possesses three superoxide dismutases, one catalase and a variety of putative glutathione- and thioredoxin-dependent peroxidases of the peroxiredoxin family (Ding *et al.*, 2000; 2004; Kaasch and Joiner, 2000; Odberg-Ferragut *et al.*, 2000). Although the parasite is obviously able to scavenge and inactivate ROS, the mechanisms by which the cell responds appropriately to changes in intracellular oxidants are still unknown.

Here, we have identified a new histone lysine methyltransferase named KMTox, which may play a role in *T. gondii* oxidative stress response (OSR). The parasite possesses a rich but still largely unexplored repertoire of ATP-dependent remodellers and histone-modifying enzymes that move, replace or decorate histones (Sullivan and Hakimi, 2006; Hakimi and Deitsch, 2007). Unexpectedly *T. gondii* exhibits a sophisticated capacity to methylate histones, rivalling the system observed in higher eukaryotic cells (Sautel *et al.*, 2007). In this study, we identify KMTox as new lysine methyltransferase targeting histones H4 and H2A. Our data reveal that KMTox interacts specifically with a typical 2-cys peroxiredoxin-1 (TgPrx1, Son *et al.*, 2001). To reduce peroxides, which are produced in each cellular compartment by metabolism and parasitism, the parasites are equipped with five peroxidases localized in the cytoplasm, mitochondrion, and presumably in apicoplast (Son *et al.*, 2001; Brydges and Carruthers, 2003; Ding *et al.*, 2004; Akerman and Müller, 2005). Peroxiredoxin is a family of bifunctional proteins that exhibit peroxidase and chaperone activity. Notably, KMTox binds to the decameric chaperone form of TgPrx1. Upon oxidation, the binding affinity between KMTox and its peroxiredoxin is enhanced. Finally, genome-wide analysis of the KMTox binding site by chromatin immunoprecipitation (ChIP) revealed a large repertoire of genes involved in regulating the OSR and the cell's homeostasis. We also noticed that, once KMTox is heavily overexpressed, the stoichiometric ratio of the methylase and the peroxiredoxin-1 is relatively disturbed as well as the transcription of some OSR genes. This could explain, to some extent, why the binding to the chromatin of overexpressed KMTox does not change upon exposure to hydrogen peroxide. In cells expressing low levels of KMTox, we showed that the protein is recruited at least in the vicinity of several OSR genes upon H₂O₂ induction. Overall, our results reveal a new putative redox-dependent transcriptional regulation in *T. gondii* involving chemical modification of histones by KMTox and the redox-sensor peroxiredoxin-1.

Results

KMTox defines a new subfamily of nuclear KMT

Phylogenetic analysis indicates that there was significant duplication and divergence of SET domain-containing genes in the *Apicomplexa* lineage (Sautel *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2008). *T. gondii* genome displays at least five distinct lineages of the SET-containing proteins with different putative substrate specificities. The SMYD family represents the largest subfamily with nine SET-containing proteins, four of which localize to the nucleus (data not shown). Close analysis reveals that KMTox (formerly SET13, Sautel *et al.*, 2007) and its orthologue SET14 formed a distinct clade with no obvious orthologues in the *Apicomplexa* lineage (Fig. S1). PSORT program analysis predicts their localization to the nucleus. Besides the conserved SET domain, KMTox contains a High Mobility Group (HMG) domain, which is absent in SET14. The domain is thought to recognize bent DNA or induces bending in linear duplex DNA. Both KMTox and SET14 are grouped with the KMT8 (formerly RIZ, Allis *et al.*, 2007) subfamily with a moderate bootstrap support. Current information concerning the KMT8 family suggests that they are involved in H3K9 methylation and chromatin-mediated gene repression (Briknarova *et al.*, 2008). One focus of our current work is to further characterize the role of KMTox in the chromatin-remodelling pathway. In particular, we aim to understand the function of the protein towards gene expression in the parasite.

To further investigate the function of KMTox, attempts were made to delete the gene. A knockout vector was constructed to replace the entire *KMTox* gene with the hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase (HXGPRT) selectable marker. Despite several attempts, PCR analysis of genomic DNA isolated from drug-resistant populations indicated that the vector had not replaced the endogenous *KMTox* gene (data not shown). We then engineered parasites to ectopically express recombinant KMTox dual-tagged with HA-Flag driven by the strong GRA1 promoter, referred to as HAFlag-KMTox-P^{GRA1}. Transgenic parasites display broad nuclear staining patterns (Fig. 1A).

KMTox forms a stable high-molecular-weight complex with peroxiredoxin-1

Several KMT enzymes are embedded into a network of proteins, which modify or directly support their activity (Qian and Zhou, 2006). We isolated KMTox-containing putative complexes from a RH-derived cell line stably expressing HAFlag-KMTox-P^{GRA1}. The fusion protein was affinity-purified from parasite whole-cell extract using anti-FLAG antibodies followed by elution of bound material

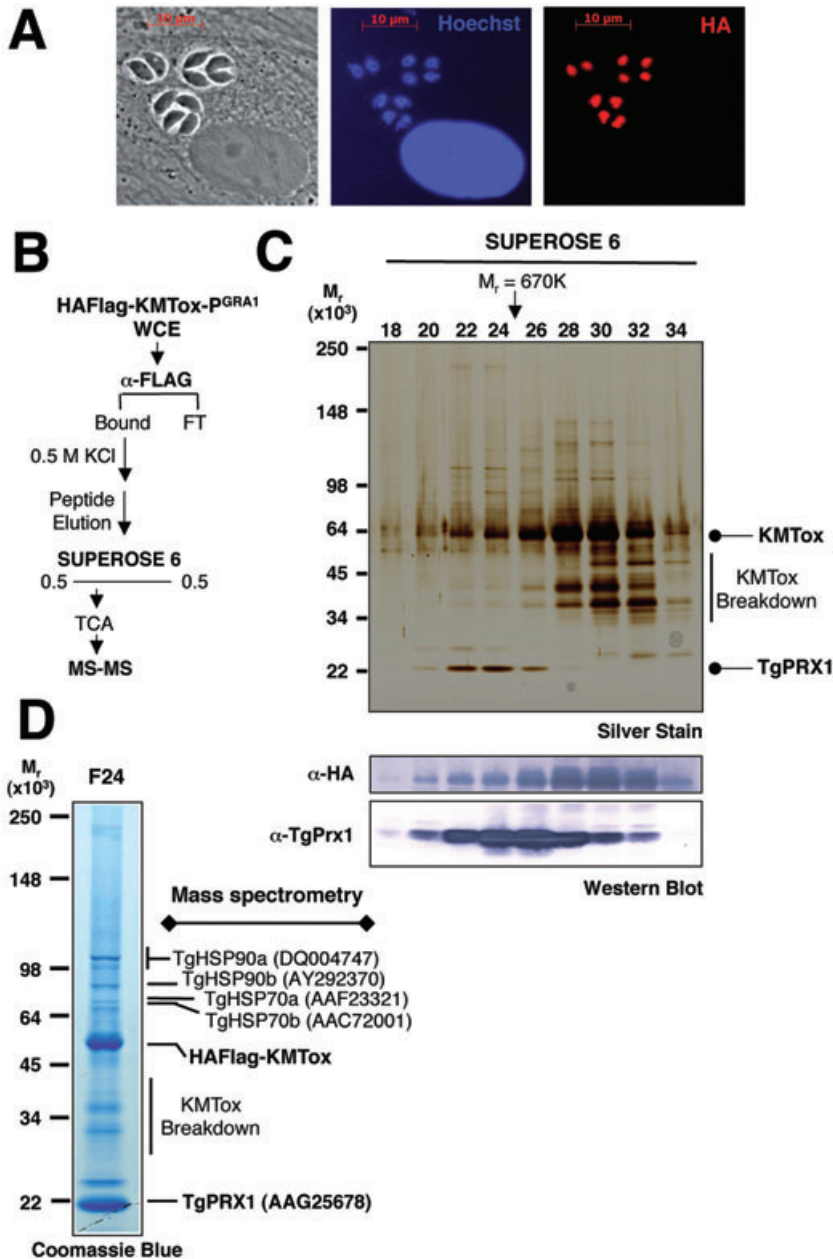


Fig. 1. Chromatographic purification of KMTox-associated proteins.

A. Co-staining with anti-HA and Hoechst 33258 of human fibroblast cells infected with transgenic *T. gondii* strain RH::HAFlag-KMTox. The transgene is driven by the strong promoter parasite-specific GRA1.

B. Purification scheme of the HAFlag-KMTox- P^{GRA1} complex. The horizontal line indicates stepwise elution. Concentrations are given in molar.

C. The flag-immunopurified eluates were further analysed by Superose 6 gel filtration. The eluted fractions were analysed by silver staining and Western blot analysis. Molecular weight markers are indicated on the left.

D. Superose 6 fraction 24 was trichloroacetic acid (TCA)-precipitated, separated by SDS-PAGE and visualized by Coomassie blue staining. Molecular weight markers are indicated on the left. The proteins identified by mass spectrometry sequencing are indicated on the right.

with FLAG peptide (Fig. 1B). The molecular masses of the KMTox complexes separated by gel filtration chromatography ranged from about 60 kDa to more than 1000 kDa (Fig. 1C). Analysis of the tryptic digest of fraction 24 by mass spectrometry identified several heat-shock proteins and the typical 2-Cys peroxiredoxin-1 (TgPrx1, gene 37.m00001 in TOXODB) as the only other protein (61% sequence coverage) (Fig. 1D). The identification of TgPrx1 was confirmed by Western blotting using antibodies previously described (Son *et al.*, 2001; Akerman *et al.*, 2005). But no interaction was observed between KMTox and the 1-Cys peroxiredoxin-2 (TgPrx2, Fig. 2A). Besides TgPrx1 is absent in affinity-purified eluate from the

RH-derived cell line stably expressing HAFLAG-TgSET4 (Fig. 2A) or -TgSET8 (Sautel *et al.*, 2007). It is noteworthy that analysis of fraction 24 revealed equal stoichiometry for KMTox and TgPRX1 compared with other unrelated proteins (Fig. 1D).

The recombinant protein TgPrx1 expressed in bacteria was reported to elute on gel sizing column at 250 kDa as a decamer (Akerman *et al.*, 2005), whereas the protein associated with KMTox is migrating into a high-molecular-weight complex of about 800 kDa (Fig. 1C). The interaction was further confirmed by reverse immunoprecipitation using Flag-TgPrx1 as bait (Fig. 2B). As reported previously, some typical 2-Cys peroxiredoxins undergo a func-

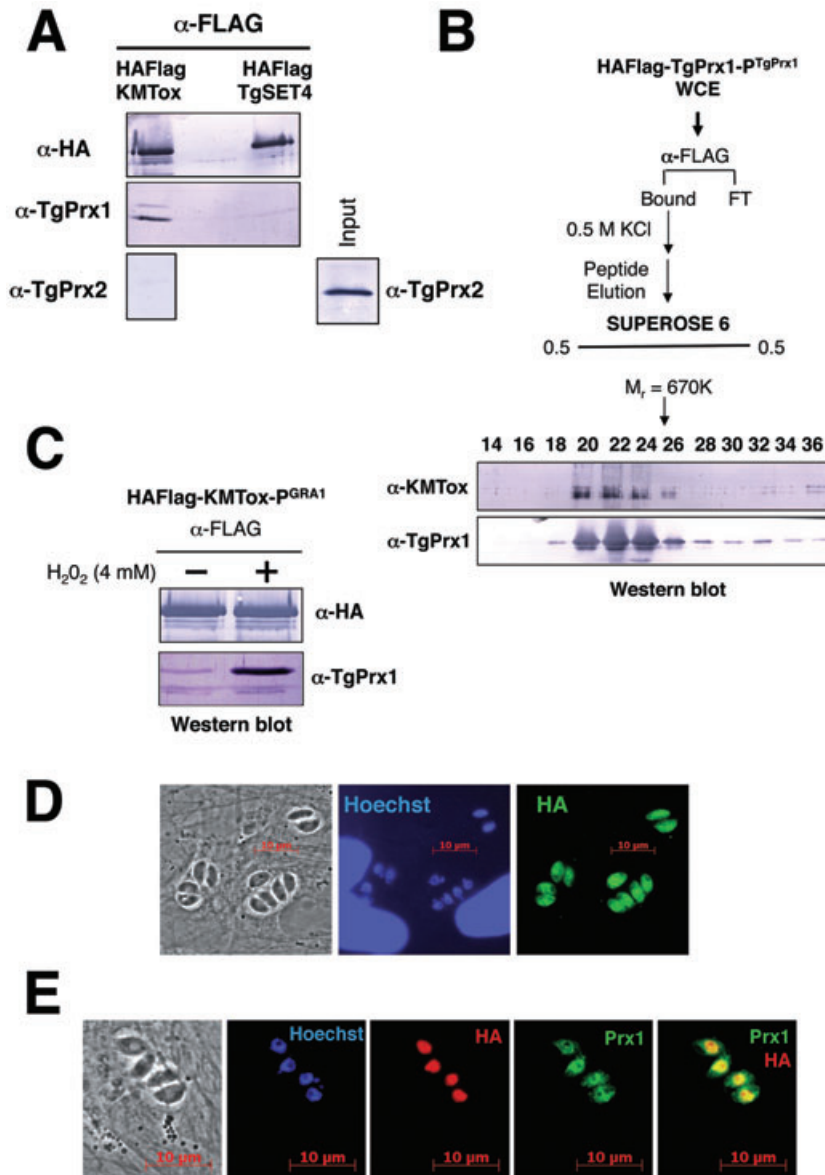


Fig. 2. Peroxiredoxin-1 interacts with KMTox in the nucleus.

A. Flag-immunoprecipitation of HAFlag-KMTox-P^{GRA1} and HAFlag-TgSET4-P^{GRA1} (gene 50.m03139) followed by Western analysis using anti-HA, anti-TgPrx1 and anti-TgPrx2 antibodies. B. Flag-immunoprecipitation of HAFlag-TgPrx1-P^{TgPrx1} followed by Superose 6 gel filtration. The eluted fractions were analysed by Western blot analysis. C. Transgenic parasites HAFlag-KMTox-P^{GRA1} were treated with H₂O₂ (4 mM, 15 min). Flag-immunoprecipitation of treated and mock lysates was analysed by Western blotting. D. Co-staining with anti-HA (green) and Hoechst 33258 (blue) of human fibroblast cells infected with *T. gondii* transgenic HAFlag-TgPrx1-P^{TgPrx1}. E. Co-staining with anti-TgPrx1 (green), anti-HA (red) and Hoechst 33258 (blue) of human fibroblast cells infected with *T. gondii* transgenic HAFlag-KMTox-P^{GRA1}.

tional change, from peroxidase to molecular chaperone, upon over-oxidation in yeast and mammals (Jang *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2005). The disulphide-bonded forms existed predominantly as dimers, whereas the reduced or over-oxidized forms of the enzyme favour the decameric state, which has molecular chaperone activity (Wood *et al.*, 2003). When the extracellular tachyzoites are treated with exogenously added H₂O₂, the yield of immunoprecipitated TgPrx1 increases drastically (Fig. 2C). Although the interaction is enhanced when TgPrx1 is subjected to over-oxidation, the reduced form of the peroxiredoxin still interacts as a decamer with KMTox in a relative smaller proportion (Figs 1C and 2B and C). The cell culture could trigger here inappropriate oxidative stress, under certain circumstances, that leads TgPrx1 to

interact with KMTox, and this without any added exogenous H₂O₂. This idea will be discussed later.

TgPrx1 was initially located in the cytosol (Son *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2004; Akerman *et al.*, 2005). Son *et al.* (2001) concluded that TgPrx1 is a cytoplasmic protein, while their antibody detected the protein in the nucleus as well. Using the same antibody we validated the localization in both cytosolic and nuclear compartments (Fig. 2D and E). This is a controversial issue that needs further investigation. However, since KMTox is exclusively localized within the parasite nucleus the presence of TgPrx1 in the compartment is highly expected. Taken together, these results demonstrate the stable association of KMTox and TgPrx1 in the nucleus, which appears to be enhanced during oxidative stress conditions.

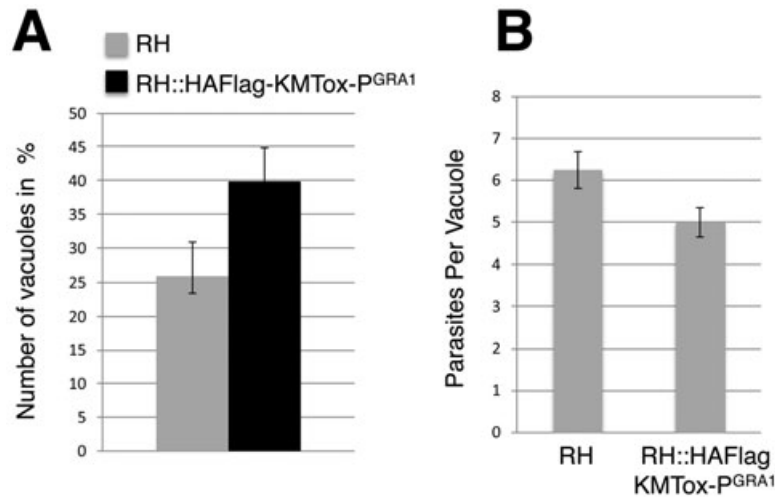


Fig. 3. Effect of H₂O₂ on parental RH and RH::HAFlag-KMTox-P^{GRA1} mutant strains.

A. Freshly released tachyzoites were incubated for 3 h in the presence of 200 μM H₂O₂, washed, inoculated onto monolayers of HFF cells and incubated in normal medium. Twenty-four hours after infection, the numbers of vacuoles were counted by scoring multiple fields under the microscope. The data are expressed as a percentage of the number of vacuoles formed by H₂O₂-treated parasites compared with untreated control parasites. Shown is a representative experiment of three.

B. The growth rate of RH::HAFlag-KMTox-P^{GRA1} parasites was compared with growth rate from wild type RH parasites. The number of parasites per parasitophorous vacuole was determined from 50 vacuoles on fixed samples by phase-contrast microscopy 24 h after infection. Shown is a representative experiment of three.

The ability of KMTox overexpression to resist oxidative stress was then measured by counting the number of vacuoles in cells infected with HAFlag-KMTox transgenic or wild-type (RH) parasites with or without H₂O₂ pre-treatment as described previously (Ding *et al.*, 2004). To avoid any interference by the host cell OSR, freshly released extracellular parasites were treated here. KMTox-overexpressing mutant parasites are notably more resistant to treatment with H₂O₂ than wild-type RH parasites (Fig. 3A), while the transgenic cell line displays a subtle growth defect than the parental RH strain under normal (no H₂O₂) conditions (Fig. 3B). Apparently, increasing KMTox expression by using a strong promoter enhances the defence capacity of transgenic parasites against hydrogen peroxide.

KMTox is a novel histone H4- and H2A-specific methyltransferase

To confirm that KMTox has HMTase activity, we tested the ability of the protein to methylate histones *in vitro*. While the recombinant protein (His)₆-KMTox purified from *Escherichia coli* had no detectable KMT activities (data not shown), the protein purified from *T. gondii* displays a significant KMTase activity towards histones H2A and H4 alone or in octamer (Fig. 4A and B). A weak activity towards histone H2B is observed but hardly reproduced (Fig. 4A). A specialized folding of KMTox most likely dependent on TgPrx1 may be required for enzymatic activity and could explain the absence of activity of the

protein expressed in bacteria. The KMTox activity on H2A within the histone octamer was weak and only visible after prolonged exposure of the film (Fig. 4A). Although reproducible, the KMTox-associated activity was relatively modest, and it has not been possible to characterize by mass spectrometry its product specificity. Since lysine 20 can be mono-, di- or trimethylated on histone H4, we investigated the methylation state of the KMTox reaction products with specific antibodies. But no enrichment for H4K20 was observed (Sautel *et al.*, 2007 and data not shown). Surprisingly, the enzyme has a marked salt sensitivity when H2A but not H4 are used as substrates (Fig. 4C). Moreover, no activity was detected *in vitro* with nucleosomes (data not shown). The alterations in substrate recognition (i.e. free histone versus nucleosome) along with the salt sensitivity observed for KMTox suggest that there must be more extensive contacts between the enzyme and its physiological substrate *in vivo*, as reported previously for human Set8 (Sautel *et al.*, 2007). We then examined the pH dependence of KMTox. The enzyme has a high pH optimum with a maximal activity at pH 8.5 and no reactions catalysed under pH 7.5 (Fig. 4D). This is consistent with the observed pH dependence of several SET-containing enzymes (Xiao *et al.*, 2005). We could hypothesize that KMTox, which required a pH-dependent deprotonations of active-site residues to carry on its activity, most likely forms di- and trimethyl-lysine on histones H4 and H2A. Moreover, the enzymatic activity is greatly enhanced (two- to fivefold) under reduced conditions towards histone H4 and even more

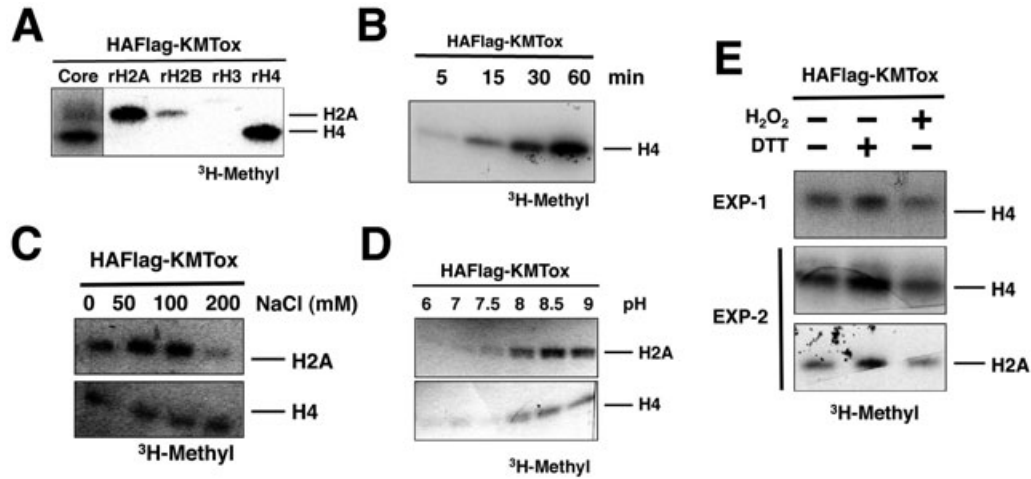


Fig. 4. KMTox methylates lysine on histones H4 and H2A *in vitro*.

A. HMTase assays (1 h, 30°C) with HAFlag-KMTox (Superose 6, fraction 24) following incorporation of (^3H CH₃) into recombinant histone substrates rH3, rH4, rH2A and rH2B or histone core.

B. Time-course HMTase assays of HAFlag-KMTox following incorporation of (^3H CH₃) into recombinant histone rH4. Reactions of HAFlag-KMTox were stopped after sequential incubation time points and analysed.

C. HMTase assays (1 h, 30°C) with HAFlag-KMTox following incorporation of (^3H CH₃) into recombinant histone substrates rH4 and rH2A in the presence of increasing concentrations of NaCl (mM).

D. pH influence the multiplicity of HAFlag-KMTox on rH2A and rH4 substrates.

E. HMTase assays on rH2A and rH4 substrates with HAFlag-KMTox pre-treated (30 min) with either H₂O₂ (10 μM) or DTT (10 μM).

significantly towards histone H2A. But the overall rate of the reaction remains unaffected after over-oxidation (Fig. 4E). An attractive model would be that the DTT-induced enzymatic enrichment is most likely mediated by the chaperone activity of TgPrx1. However, how TgPrx1 fine-tunes the methylase activity *in vivo* still awaits characterization.

KMTox ChIP-on-chip on tiling arrays

To define the genes associated with KMTox binding *in vivo*, we mapped KMTox across the *T. gondii* genome using ChIP combined with tiling microarrays. Soluble chromatin was prepared from a transgenic parasite expressing ectopic HAMyc-KMTox-P^{GRA1} in the nucleus (Fig. 5A) and subjected to immunoprecipitation with the α -Myc antibody. Simultaneously, ChIP-on-chip was also performed using antibodies recognizing very abundant chromatin landmarks such as acetylated histone residues [e.g. acetylated histone H4 (K5-K8-K12-K16)] (Fig. 5B, Sautel *et al.*, 2007). Acetylation of histone H4 is considered to be a mark for ongoing transcription. A histogram that displays log₂ measurement ratios (ChIP-enriched DNA/total genomic DNA) was used to determine the quality of the enrichment (Scacheri *et al.*, 2006). The distribution appeared asymmetrically bell-shaped with a distinct tail at the left-hand side. Overall a specific enrichment is observed across the 14 *T. gondii* chromosomes. As expected, the signals produced by KMTox binding site are not only characterized by a large

value at the corresponding probe (cut-off >3, Fig. 5B), but also by a roughly triangle shape induced by the binding site (b in Fig. 5B). In contrast, single probes yielding high ratio measurements most likely represent experimental noise (a in Fig. 5B). We note that the great majority of HAMyc-KMTox binding sites are spaced far from each other. However, occasionally, there were small chains (typically two to three peaks per chain) of binding sites spaced < 2 KB from each other (b in Fig. 5B). Independent scanning ChIP validations were also performed on several loci. None of the KMTox negative loci was scored, while a majority of the positives were retrieved (23 over 28, see Table S1). The absence of enrichment in five locations may not result exclusively from the absence of the factor at the locus, but could also be explained by epitope masking or the initial biological conditions.

Systematic identification of clusters with KMTox pattern

Importantly, KMTox binding sites are mostly localized at hyperacetylated histone H4-enriched regions (data not shown and Fig. 5B). Moreover the genome-wide binding patterns for KMTox and TgSET8 are absolutely different. TgSET8 is known to methylate H4K20 and to silent heterochromatic domains (Sautel *et al.*, 2007). Thus, KMTox seems to preferentially target euchromatin domains. We then analysed in greater detail the distribution of KMTox binding sites (Table S1). For initial screens, a simple windowing approach is used to define ChIP-enriched genomic regions as being spanned by a minimum of three

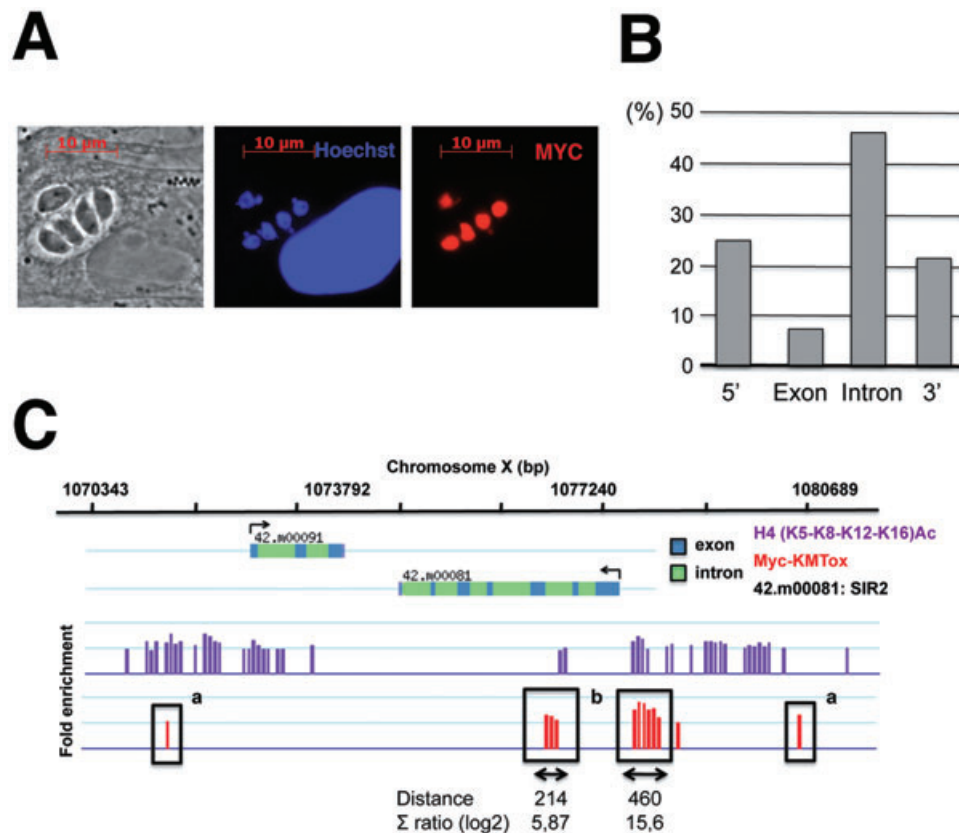


Fig. 5. Genome-wide mapping of KMTox binding sites *in vivo* by ChIP-on chip array.

A. Co-staining with anti-MYC and Hoechst 33258 of human fibroblast cells infected with transgenic *T. gondii* strain HAMyc-KMTox-P^{GRA1}.

B. Analysis of 160 KMTox-binding loci (see Table S1). The graph represents the fraction for each selected categories: 'Proximal region', describing KMTox locations residing 2 kb upstream (5') or downstream (3') the start and the stop codon respectively; exon (E) and intron (I) regions within TOXODB (4.0) annotated genes.

C. A close-up view of chromosome X regions (SIR2 locus). The horizontal bars represent possible binding regions identified by a Signal Map Software. The height of the bar is the signal strength of the probe. A threshold of 1.5 and 2 were applied to myc-KMTox (red) and to acetylated histone H4 (purple) respectively. Green (intron) and blue (exon) boxes indicate TOXODB gene annotation. The data are visualized here by the Genobrowser software.

probes shaped like peaks or triangles with ChIP log ratio enrichment >3 . An example of high-resolution histone acetylation and myc-KMTox patterns within target genes is shown in Fig. 5B. Annotation of the top-ranked hit for each sequence revealed that 25% and 21% overlapped with the 5' and 3' flanking region respectively. A remarkably large fraction of targets was located in introns (46%, Fig. 5C). It was clear that, independent of gene length, the typical KMTox-targeted gene shows a distinct peak around the start codon, after the stop codon or within the intron of the coding region. We then analysed the target gene repertoires of KMTox. The cellular functions that are primarily regulated by KMTox are antioxidant defences, chromatin and transcription machineries, heat-shock and chaperone proteins, translational apparatus and carbohydrate metabolism (Table S1).

As expected, KMTox targeted several primary antioxidants. They include superoxide dismutase, oxidoreductase, thioredoxin reductase, glutathione reductase or

nucleoredoxin genes (Table S1). In addition KMTox targeted several metabolic enzymes that contribute to the pentose phosphate pathway (e.g. glucose-6P dehydrogenase and transaldolase), the trehalose synthesis (phosphoglucosyltransferase) and the glycerol metabolism (glycerol-3-phosphate dehydrogenase). These pathways are known to be indispensable to maintenance of the cytosolic pool of NADPH and thus the cellular redox balance. Thus, in yeast there is a resetting of carbohydrate metabolism after the exposure to H₂O₂ (Godon *et al.*, 1998). Carbohydrate fluxes are redirected to the regeneration of NADPH at the expense of glycolysis. NADPH is indeed essential in the OSR as a cofactor for thioredoxin reductase and glutathione reductase, two critical activities in the cellular thiol redox control and antioxidant defence.

The targeting by KMTox of genes coding for protein implicated in chromatin remodelling and transcription is probably important for switching the cellular activity from biosynthetic towards protective functions (Table S1).

These proteins may help to reorchestrate the cell's metabolism to the needs of the OSR. Another pertinent KMTox target was SIR2, which is a NAD-dependent histone deacetylase known to be essential in transcriptional silencing (Fig. 5B). It was suggested previously that the ratio of oxidized-to-reduced nicotinamide adenine dinucleotides could regulate the activity of SIRT1, the mammalian orthologue of SIR2 (Fulco *et al.*, 2003). This establishes an important link between redox balance and chromatin dynamics, and, by extension, a link between redox status and overall gene expression. By regulating the *SIR2* gene, KMTox is probably acting indirectly through the SIR2-dependent transcriptional network. Another functional category involves H2AZ, the alternative histone whose substitution into chromatin locally influences transcription (Kobor *et al.*, 2004). Two of nine components of SWR1, the complex that substitutes histone H2AZ for H2A in chromatin, were identified, as was H2AZ itself (Table S1).

Finally, chaperones (cyclophilin), heat-shock proteins along with enzymes of the ubiquitin pathway, were identified as KMTox targets. Heat-shock proteins are induced in response to a wide variety of stress conditions and are important for the protection of cells from these adverse conditions. Moreover, several genes are involved in DNA repair such as the proliferating cell nuclear antigen 1 (PCNA1, Table S1). PCNA is particularly susceptible to oxidative stress in human cells (Montaner *et al.*, 2007). The protein improves the speed and processivity of DNA polymerases. It also participates in DNA mismatch repair, and in nucleotide and base excision repair (Moldovan *et al.*, 2007). Several unknown genes harbour as well KMTox binding sites but the functional relation to the stress response needs further investigation. Collectively, the ChIP data provide strong evidence that the majority of KMTox binding sites are found closed to genes that are able to regulate the OSR.

Specific targeting of KMTox to OSR genes is induced by hydrogen peroxide

To rigorously evaluate the primary location data, we performed scanning ChIP (SChIP) under oxidative stress conditions. At first glance, no significant differences in chromatin binding were observed for KMTox upon exposure to hydrogen peroxide (data not shown). Based on this, we reasoned that the binding of KMTox to the target sites under normal conditions might be due to the fact that the protein is heavily overexpressed and the stoichiometric ratio of KMTox and peroxiredoxin-1 is disturbed. This could possibly explain why we do not see any effect on KMTox's binding to chromatin whether the cells are stressed or not. In this context, we decided to assess the effects of hydrogen peroxide on parasite lines expressing

lower level of KMTox. To ensure appropriate levels and timing of expression, the coding region was driven by endogenous promoter of KMTox, which was provided by a 1.472 kb 5' genomic flanking region. Under its endogenous promoter, the chimerical protein HAFlag-KMTox is barely expressed but still localized within the nucleus (Fig. 6A). When overexpressed and under normal conditions, KMTox binds strongly to TgPrx1, while the interaction is hardly seen when the protein is expressed at low levels (Fig. 6B, compare line 4 with lines 5–6). However, the interaction increases drastically upon hydrogen peroxide induction when the levels of KMTox are low (Fig. 6B, lines 7–11). Thus, KMTox still interacts with TgPrx1 but with different kinetics from that seen when the protein is overexpressed. For this reason, we repeated the ChIP experiments using the line expressing a more appropriate amount of KMTox to determine if the chromatin binding is in fact under the control of the redox state. Using a semi-quantitative SChIP assay, we first validate the ChIP-chip data at four primary KMTox-targeted antioxidant genes (Fig. 6C and D). As previously shown, KMTox, when overexpressed, binds constitutively to the target genes and no significant variations were detected upon H₂O₂ treatment (Fig. 6C, lines 5–8, and Table S1). On the other hand, by using a line expressing a lesser amount of the methylase, the relative fold enrichment of the protein increases drastically upon H₂O₂ induction (Fig. 6C, lines 1–4, and Fig. 6D). In other words, KMTox is specifically target to some antioxidant genes only in stressed cells. But the rule could not be applied to all KMTox-identified targets. For instance, decreasing the expression of KMTox is not enough to prevent the protein to bind to chromatin in the neighbourhood of the nucleoredoxin-encoding gene (42.m00038) (Fig. 6C, line 1, and data not shown), suggesting that the chromatin targeting is not exclusively hydrogen peroxide-dependent. We also considered the possibilities that antioxidants could have been pre-induced by the H₂O₂ present in culture medium (Halliwell, 2003). In this way, cell culture could impose a state of oxidative stress on cells. We might expect, in this condition, that KMTox regulates the imbalance between the levels of ROS by binding to particular genes that should be more sensitive to low variation of the redox state.

As shown here, location analysis provides a significant amount of information regarding the recruitment of KMTox to portions of the genome. However, we cannot assume that the observed binding close to or within a gene inevitably leads to activation or repression of its expression. Indeed, there are many instances in which a factor is bound to its target gene irrespective of the transcriptional status of the gene. Given that the KMTox-overexpressing line is more resistant to H₂O₂ than the wild type (Fig. 3A), we tested whether the increased resistance to hydrogen

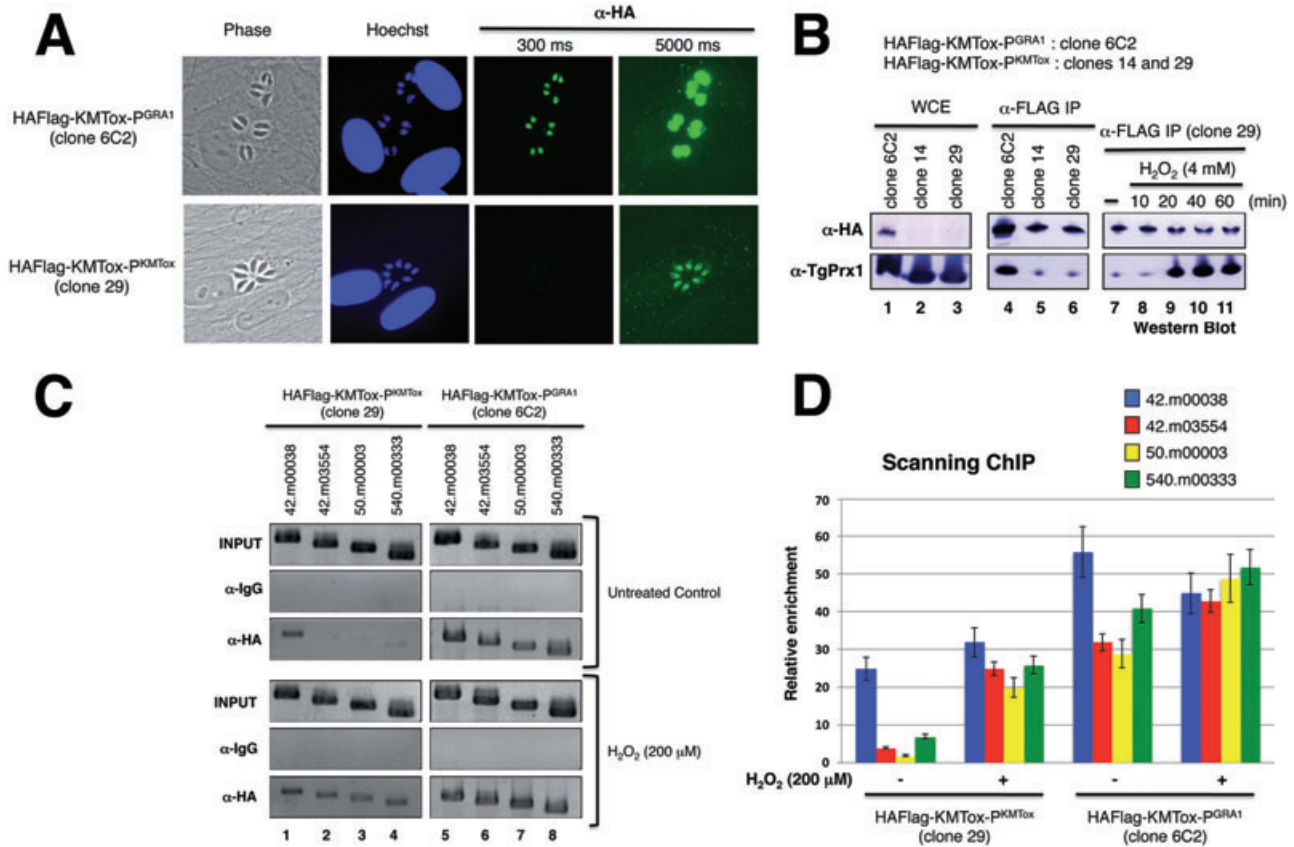


Fig. 6. KMTox recruitment to several OSR genes is stimulated by hydrogen peroxide when the enzyme is not overexpressed.

A. Co-staining with anti-HA and Hoechst 33258 of human fibroblast cells infected with transgenic *T. gondii* strain RH strain expressing ectopically HAFlag-KMTox under its own promoter (clone 29) or under the GRA1 promoter (clone 6C2), using exposure times from 300 to 5000 ms.

B. Flag-immunoprecipitation from HAFlag-KMTox-P^{KMTox} (clones 14 and 29, 1×10^8 parasites per IP) and HAFlag-KMTox-P^{GRA1} (clone 6C2, 1×10^7 parasites per IP) followed by Western analysis using anti-HA and anti-Prx1 antibodies. Transgenic parasites HAFlag-KMTox-P^{KMTox} (clone 29) were also treated at different time points with H₂O₂ (4 mM). Flag-immunoprecipitation of treated and mock lysates was analysed by Western blotting with HA and TgPrx1 antibodies.

C. Scanning ChIP analysis of four KMTox target genes (see Table 1). Tachyzoites from HAFlag-KMTox-P^{KMTox} and HAFlag-KMTox-P^{GRA1} strains treated (200 μ M, 45 min) or not with hydrogen peroxide were processed for ChIP using anti-HA ChIP grade antibody. A chromatin sample with an irrelevant antibody was used as negative control (IgG) and genomic DNA as positive control for PCR (input).

D. Means from three independent experiments \pm SD are given. The input PCR signal was set at 100% and the numerical value of the ChIP signal represents the percentage of input. The amount of immunoprecipitated DNA determined by semi-quantitative PCR was normalized to the respective input DNA for each sample (shown in arbitrary units). Each bar is an average of three independent experiments.

peroxide is due to variation in the expression level of oxidative stress and antioxidant defence genes. The RT-PCR studies include gene-encoding catalase (44.m00005), glutathione reductase (50.m00003) and oxidoreductase (540.m00333). We first observed a significant increase of 50.m00003 and 540.m00333 mRNA levels upon H₂O₂ treatment but only when KMTox is not overexpressed (Fig. 7). In contrast, gene-encoding catalase is constitutively expressed and not affected by the H₂O₂ exposure in all cell lines tested, in agreement with experiments previously reported (Ding *et al.*, 2000; 2004). The preceding findings suggested that KMTox could regulate the expression of genes that control the neutralization of H₂O₂, such as glutathione reductase (50.

m00003) and oxidoreductase (540.m00333). By over-expressing KMTox, we ultimately enhance the antioxidant activity of the cells probably by disturbing the hydrogen peroxide signalling pathway, keeping inducible OSR genes permanently on. Further investigations will be necessary to resolve how KMTox is co-ordinating expression of these genes in response to oxidative stress.

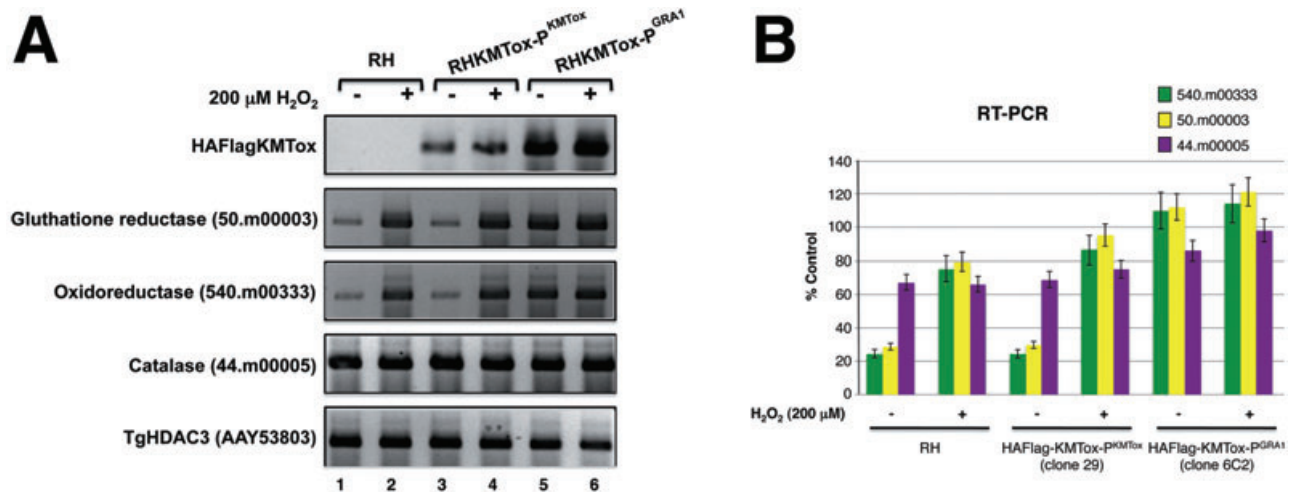
Discussion

In the case of *Toxoplasma*, evasion of ROS may be an important step in pathogenesis. The nature of this evasion, as well as the mechanism of activation of the OSR, is still unknown. *Toxoplasma* appears able to 'turn

Table 1. KMTox targets chromatin nearby OSR genes in *Toxoplasma gondii*.

Gene (TOXODB)	Predicted Fct	Location				ChIP-on-chip Enrichment		SChIP
		5'	E	I	3'	Σ ratio (log ₂)	Distance (bp)	
KMTox target proteins with antioxidant scavenging/defence properties								
583.m00021	Superoxide dismutase (SODB1)			x		9.79	460	Yes
					x	16.02	542	
583.m00002	Peroxiredoxin (Prx2)	x				10.27	296	n.d.
					x	7.24	214	
50.m00003	Glutathione reductase (GR1)	x				13.48	296	Yes
38.m01100	Glutathione reductase (GR2)				x	10.15	378	Yes
57.m00002	Glutathione / thioredoxin peroxidase (GPx1)				x	11.34	460	n.d.
57.m03094	Glutathione / thioredoxin peroxidase (GPx2)			x		10.71	460	No
					x	17.37	378	
42.m03554	Glutaredoxin (Grx2)	x				12.87	378	Yes
83.m01245	Thioredoxin II (Trx)			x		6.92	214	n.d.
540.m00333	Oxidoreductase			x		11.04	296	Yes
583.m05523	Oxidoreductase			x		14.31	378	Yes
59.m03597	Oxidoreductase			x		15.31	624	n.d.
42.m00118	Oxidoreductase		x			9.82	296	Yes
					x	6.22	378	
42.m00038	Nucleoredoxin			x		11.38	296	Yes
Antioxidant proteins that are not regulated by KMTox								
583.m00013	Mitochondrial superoxide dismutase (SOD2)							
583.m00020	Mitochondrial superoxide dismutase (SOD3)							
44.m00005	Catalase (CAT)							
37.m00001	Peroxiredoxin (Prx1)							
44.m00002	Mitochondrial peroxiredoxin (Prx3)							

The table indicates the genomic location of KMTox over each loci. The signal from multiple closely spaced probes will often form a peak at or near the binding site. For each peaks, the signals (selected cut-off = 3) were simply summed [Σ ratio (log₂)] over the distance of the peak (bp). Positive (Yes) or negative (No) enrichment by control scanning ChIP is indicated. The chromosomal regions were clustered into four main DNA sequences: the exon (E), the intron (I), the upstream (5') and downstream (3') proximal regions of the predicted coding sequence according to the TOXODB nomenclature. n.d. non-determined.

**Fig. 7.** Overexpression of KMTox interferes with the transcription of some OSR genes.

A. Semi-quantitative RT-PCR were performed for the indicated genes using RNAs from RH, HAF1ag-KMTox-P^{KMTox} and HAF1ag-KMTox-P^{GRA1} strains treated or not with hydrogen peroxide (200 μM, 45 min).

B. Means from three independent experiments ± SD are given. The expression of the selected genes was calculated as the percentage of TgHDAC3 (AAY53803) expression.

off the phagocytic burst (Wilson *et al.*, 1980), but alveolar macrophages can kill *Toxoplasma* using an oxygen-independent pathway (Catterall *et al.*, 1986). Moreover, to protect itself against ROS produced by mitochondrial respiratory activity, *T. gondii* relies on superoxide dismutases (TgSOD2 and TgSOD3) and 2-cys peroxiredoxin (TgPrx3) (Ding *et al.*, 2004). Notably, KMTox does not target these genes or the catalase whereas it binds to the majority of the antioxidant genes (Fig. 6D). The cytosolic catalase of *T. gondii* plays a role against oxidant stress imposed by the host although the gene appears not to be essential for survival (Ding *et al.*, 2004). Moreover, the parasite possesses efficient back-up systems that allow it to maintain its intracellular redox balance similar to *Plasmodium* species without catalase (Ding *et al.*, 2004). Our data suggest that KMTox contributes to build an antioxidant 'firewall', which would neutralize the oxidative assault generated by the host cell and to some extent by endogenously produced ROS, those that are not oxidative respiration by-products.

KMTox may regulate gene expression in *T. gondii* by providing the rapid re-arrangement of chromatin domains probably in response to oxidative stress signals. In yeast, increased concentration of hydrogen peroxide leads to the nuclear accumulation of the transcription factor Yap1 and an increase of its biological activity (e.g. induction of antioxidant gene expression) (Wood *et al.*, 2004). In contrast, KMTox is not shuttling between the cytoplasm and the nucleus even after H₂O₂ exposure (Fig. S2B), but its location on chromosomes is apparently redox-dependent. Still this is not true for every target genes identified by ChIP-chip. It should also be noted that the yield of KMTox expression affects drastically the response to hydrogen peroxide. Thus, the binding of overexpressed KMTox to chromatin nearby the OSR genes persists even in absence of H₂O₂, which could explain the misregulation of gene expression, along with the resistance to H₂O₂ of the overexpressing cell line. Based on these broad observations, we speculate that KMTox regulates some genes that function against oxidative stress possibly through TgPrx1. Thus, the KMTox-centred gene expression regulatory system creates a co-ordinated cellular defence against oxidative stress. Other uncharacterized factors are expected to play a role in these processes. Co-ordinated and inducible expression of these defence proteins should be important and need further investigations.

One of our earlier concerns – the implication of TgPrx1 to the KMTox network – remained still unresolved. In yeast, in response to peroxide stress, Yap1 is activated by formation of a disulphide bond, which promotes its nuclear localization. Gpx3, which has peroxidase activity, is required for the formation of the disulphide bond in Yap1 (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2004). Although the binding of

TgPrx1 to KMTox increases upon oxidation, we have yet to find evidence of disulphide bond formation (data not shown). Based on this observation, it was difficult to decipher the mechanism by which TgPrx1 acts on KMTox. Several lines of evidence suggest that 2-Cys peroxiredoxins have dual roles as regulators of the H₂O₂ signal and as defenders of oxidative stress. 2-Cys peroxiredoxins appear to regulate intracellular signalling via direct protein–protein interactions using hydrogen peroxide as a messenger. Upon oxidative stress, 2-Cys peroxiredoxins undergo over-oxidation of the active-site cysteine, which causes loss of the peroxidase function. The over-oxidized 2-Cys peroxiredoxins then multimerize into a high-molecular-weight chaperone complex (Wood *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2005). Here, we have strong evidence that TgPrx1 binds to KMTox as a decamer with a putative chaperone activity, which awaits characterization (Figs 1 and 2). We also noted that KMTox enzymatic activity is slightly enhanced under reduced conditions raising the possibility that ROS generated *in vivo* affect its overall activity or substrate specificity (Fig. 4E).

Our genome-wide location assay has revealed that KMTox occupies wider regions that spread out well beyond the predicted promoter region, at KMTox genes. It is conceivable that KMTox is poisoning genes for transcription initiation or is protecting euchromatin from silencing. We do not exclude the possibility that KMTox could also be important in transcription elongation. Thus, KMTox target chromatin near genes-encoding elongation factors and RNA polymerases subunits as well (Table S1). Even the gene-encoding lysine methyltransferase Set2 is a target of KMTox (Table S1). Previous work links transcriptional elongation with histone H3-K36 methylation by Set2, which is required to prevent inappropriate initiation within protein-coding regions masked by chromatin (Lee and Shilatifard, 2007). Therefore, KMTox might modulate specifically the yield of RNA transcripts by interfering with the elongation step of transcription. These possibilities are currently under investigation.

The response mechanisms to stress require a complex network of sensing and signal transduction leading to the adaptation of cell growth along with the adjustments of the gene expression programme and metabolic activities. The molecular responses dictate whether the parasite adapts, survives or, if injured beyond repair, undergoes death. Cells react to oxidative stress by launching a defence response through the induction of nuclear gene expression. The comparative analysis of H₂O₂-induced gene expression across kingdoms reveals that the H₂O₂ antioxidant response in mammals is not inducible but constitutive, which contrasts with the ROS-inducible responses in yeast and plant (Desaint *et al.*, 2004; Vandenbroucke *et al.*, 2008). The difference may relate to the way of living of each organism. The intracellular

location of apicomplexan parasites for most of their life cycle should theoretically protect them from being continuously exposed to high levels of environmental ROS, once they escape the phagocytic burst generated by macrophages. This work has provided a partial sketch of the regulatory circuits that control ROS in *T. gondii*. We uncovered the importance of KMTox in cellular protection against oxidative stress. In the future, the resolution of H₂O₂-induced transcriptome map in the parasite will complete our data and lead to new insights into the evolution of the transcriptional response in *T. gondii*.

Experimental procedures

Parasite methods

Standard laboratory methods and techniques for *T. gondii* manipulations were used. RH strains of *Toxoplasma* were grown in human foreskin fibroblasts (HFFs), transfected, and cloned by limiting dilution as described previously (Saksouk *et al.*, 2005). The *RHhxgprt*⁻ strain used in these studies contains a deleted or defective *HXGPRT* gene, which allows for the selection of transfected tachyzoites using mycophenolic acid (Donald *et al.*, 1996).

Antibodies

A rabbit antiserum was raised against recombinant rKMTox according to the protocol of the manufacturer (Eurogentec) and affinity-purified against the recombinant protein rKMTox. A 1:1000 dilution of polyclonal anti-KMTox antibody was used to perform Western blot analysis. Primary antibodies for IFA, Western blot and ChIP included antibodies against haemagglutinin epitope tag (α -HA, Roche Diagnostic, dilution at 1:1000), ChIP grade α -HA (Abcam, ab9110), c-Myc (9E10, Santa Cruz Biotechnology, dilution at 1:1000), α -Flag (Sigma), affinity-purified polyclonal antibody anti-TgPrx1 (a kind gift from Dr Ho-Woo NAM, Catholic University of Korea) and anti-Prx2 (a kind gift from Dr Sylke Muller, University of Glasgow, UK).

Immunofluorescence assay (IFA) and Western blot analysis

Immunofluorescence and immunoblotting assays were performed as described previously (Saksouk *et al.*, 2005). The nuclei were stained with Hoechst 33258 (Molecular probes) and the coverslips were observed using an Axioplan 2 (Carl Zeiss).

Construction of *T. gondii* expression vectors

The partial coding sequence of KMTox (TOXODB, Accession No. 74.m00443) was amplified by RT-PCR to introduce BamHI and ClaI sites at the start and the stop codons respectively. Primers forward (5'-GGATCCGAGATTCGCGTGGAACGAAGAAAC-3') and reverse (5'-AGCGGCCGT TTAATCGATGGCTTTGAGAGA-3') were used for PCR

amplification. The PCR product allowed the cloning of KMTox in frame with an N-terminal HAFlag tag into the *T. gondii* expression vector pMAH14 (GRA1 promoter, Saksouk *et al.*, 2005) to create the pCS2 vector. To generate the vector-expressing HAFlag-KMTox-P^{KMTox}, we replaced the GRA1 promoter in pCS2 by a 1.472 kb 5'-genomic flanking region of KMTox amplified by PCR with the forward (5'-GAGCTCTAGAAAGAATTCCTGTTCTGAG-3') and reverse (5'-GGATCCCACGCACTCGGAAGCCATGTCTTC-3') primers. The coding sequence of TgPrx1 (Son *et al.*, 2001) was amplified by RT-PCR to introduce BamHI and EcoRI sites. Primers forward (5'-GGATCCCCGCCCCGATGGTGTCTCAGCCAG-3') and reverse (5'-GAATTCCTTGCTTCCGAGATACTCCTTAAC-3') were used for PCR amplification. The PCR product allowed the cloning of TgPrx1 in frame with a C-terminal HAFlag tag into the *T. gondii* expression vector pMAH14 (Saksouk *et al.*, 2005) to generate the pCS28 vector.

Chromatographic purification of KMTox- and TgPrx1-containing complexes

Whole-cell extract (WCE) from transgenic extracellular tachyzoites expressing ectopically HAFlag-KMTox or HAFlag-TgPrx1 was incubated with 500 μ l of anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma) for 1 h at 4°C. Beads were washed with 10 column volumes of BC500 buffer [20 mM Tris (pH 8), 0.5 M KCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% NP40, 0.5 mM PMSF, aprotinin, leupeptide, pepstatin, 1 μ g ml⁻¹ each]. Bound peptides were eluted stepwise with 250 μ g ml⁻¹ FLAG peptide (Sigma) diluted in BC500 buffer. Each preparation was sufficiently clean such that individual peptide bands could be excised and sequenced by mass spectrometry.

Mass spectrometry peptide sequencing

Protein bands were excised from colloidal blue-stained gels (Invitrogen), oxidized with 7% H₂O₂ and subjected to in-gel tryptic digestion. Peptides were extracted with 5% (v/v) formic acid solution and acetonitrile, and injected into a CapLC (Waters) nanoLC system that was directly coupled to a QTOF Ultima mass spectrometer (Waters). MS/MS data were acquired and processed automatically using MassLynx 3.5 software (Waters). Tandem mass spectra were searched against a compiled *T. gondii* database using the MASCOT program (Matrix Sciences, London) available intranet.

Histone methyltransferase assay

KMTox-containing complexes were purified as described above. Recombinant *Xenopus* histones rH4, rH3, rH2A and rH2B (CHEMICON/Upstate) were used. Histone core and mononucleosome were extracted from tachyzoite (RH strain) as described previously (Sautel *et al.*, 2007). Histone methyltransferase assays were carried out at 30°C for 5–60 min in triplicate in a total volume of 30 μ l. A typical reaction contained S-adenosyl-L-[methyl-3H] methionine (AdoMet) (specific activity 15 Ci mmol⁻¹; Amersham), substrate histone and

enzyme in assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.5 mM DTT and 1 mM PMSF). The reaction was stopped by addition of SDS sample buffer. The reaction mixtures were analysed by 10–20% SDS-PAGE gradient gel and autoradiography was performed using a Phospho-imager.

Hydrogen peroxide treatment

The growth inhibitory effect of hydrogen peroxide was analysed as described previously (Ding *et al.*, 2004). Freshly lysed parasites were washed three times with serum-free DMEM and treated with 200 μ M of H₂O₂ in DMEM for 3 h at 37°C. Treated and untreated parasites were washed, inoculated onto monolayers of HFF cells grown on glass coverslips and incubated in normal medium. Twenty-four hours after infection, the numbers of vacuoles were counted by scoring multiple fields under the microscope. The data are expressed as a percentage of the number of vacuoles formed by H₂O₂-treated parasites compared with untreated control parasites. The effect of H₂O₂ treatment on TgPrx1–KMTox interaction was assessed by incubation of freshly lysed parasites RH::HAFlag-KMTox or RH::HAFlag-TgPrx1 with various concentrations of H₂O₂ (200 μ M to 4 mM) for 15 min at 37°C. The treated and untreated are lysed as described above. The effect of H₂O₂ treatment on KMTox activity was assessed by pre-incubating the affinity-purified KMTox complex with H₂O₂ (10 μ M) in presence or not of DTT (10 μ M) at 30°C for 30 min, followed by 1 h of incubation with the S-adenosyl-L-[methyl-3H] methionine (AdoMet) and the specific histone substrate.

ChIP-on chip array

Scanning ChIP and the ChIP-on-chip experiments were performed as described previously (Sautel *et al.*, 2007). Briefly the generation of amplicons from the individual ChIP DNA sample was performed according to the manufacturers' protocol (NimbleGen) and as described previously (Sautel *et al.*, 2007). In brief, sample DNA was blunted with T4 DNA polymerase (New England Biolabs) and ligated to the linker oligonucleotides (oligo-1: 5'-GCGGTGACCCGGGAGATCTG AATTC-3', oligo-2: 5'-GAATTCAGATC-3') by means of T4 DNA ligase (New England Biolabs). Linker-ligated samples were amplified by PCR with oligo-1 probe as a primer, and PCR products were purified by QiAquick PCR purification kit (Qiagen). Oligonucleotide array analysis was performed by NimbleGen Systems as a part of a Chromatin Immunoprecipitation Array Service (NimbleGen). We used custom synthetic tiling microarrays. Two NimbleGen arrays (387 000 features per array, 46–50mer oligos) that cover the whole *T. gondii* genome (<http://ToxoDB.org>) were hybridized with genomic DNA and either myc-KMTox or acetylated H4 (K5, K8, K12, K16)-bound DNA from a ChIP. Probes on the array were spaced at a density of one probe per 50 bp. Data represent the average of two biological replicates. In a typical two-colour ChIP-chip experiment, two different populations of DNA are labelled with distinct fluorophores and co-hybridized to arrays. One population corresponds to enriched genomic fragments captured by ChIP. The other population corresponds to total genomic DNA and serves as a reference for hybridization. To normalize array data, the log₂ of the ratio of

Cy5 (Myc-KMTox ChIP amplicons) to Cy3 (Total DNA amplicons) for each point was calculated. Then, the biweight mean of this log₂ ratio was subtracted from each point; this procedure is approximately equivalent to mean-normalization of each channel. For our peak detection method, we use a percentile for each array (95th and 98th percentile) of log₂ oligomer ratios as described (Sautel *et al.*, 2007). A histogram that displays log₂ measurement ratios (ChIP-enriched DNA/total genomic DNA) was visualized by the SignalMap software (NimbleGen) and by Genobrowser. Each bar represents a probe. The left and right boundary of the bar represent the genomic starting and ending position of the probe respectively. The height of the bar is the signal strength of the probe. Statistical analyses of the ChIP signal repartition were performed described previously (Sautel *et al.*, 2007). SCHIP was performed as described (Sautel *et al.*, 2007). The sequences of primer pairs used for PCR are 42.m00038-F (5'-GAGACTGCTTTCTGAAGGCTTTGTC-3') and 42.m00038-R (5'-GACTTCTCTGGCACTTTTCGCTT AAC-3'); 42.m03554-F (5'-GTATGCAGGAAGTTGACACTG AAAC-3') and 42.m03554-R (5'-CACTGCTTGAACATGCA CGTGACAC-3'); 50.m00003-F (5'-CTCAAAGGCTCTACA CAGAGAAACC-3') and 50.m00003-R (5'-CTCTTCG CCATACTTTGTGATGCAG-3'); 540.m00333-F (5'-GACAGC AGACTTACCTTACGAATCC-3') and 540.m00333-R (5'-GTCTGCATCTGTGTAAGGTTGGAGC-3').

Semi-quantitative RT-PCR

Semi-quantitative RT-PCR was performed for the indicated genes using RNAs from RH, RHKMTox-P_{KMTox} and RHKMTox-P_{GRA1} strains treated or not with hydrogen peroxide. Means from three independent experiments \pm SD are given. The expression of the selected genes was calculated as the percentage of TgHDAC3 (AAY53803) expression. We used the following primers for RT-PCR: 50.m00003-F (5'-TTCGACGACATGATCAGCATGC-3') and 50.m00003-R (5'-TATCGCAACGGGAGTTAGTTC-3'); 540.m00333-F (5'-CAAATGCATATCTCCCTTCTGTC-3') and 540.m00333-R (5'-CAGATTCGCAAACGATGTGGAAG-3'); 44.m00005-F (5'-GCTCGTTCGGAAAGTGTGCATC-3') and 44.m00005-R (5'-CAAGTCTGTGCCGATGAGTGTGTCG-3'); TgHDAC3-F (5'-TGAAACCTCAGCGAATTCGCATG-3') and TgHDAC3-R (5'-GTGGAAGGAAACCGTCATCACG-3').

Acknowledgements

Thanks go to Drs Ho-Woo NAM, Catholic (University of Korea) and Sylke Muller (University of Glasgow, UK) for antibodies. We thank Dr W.J. Sullivan Jr and people from our lab, for advice and helpful comments. We thank Dominique Cannella for technical help. M.A. Hakimi is supported by grants from CNRS (ATIP+), ANR (Agence National de la Recherche, MIME Program 2006) and INSERM (Contrat d'Interface). Preliminary genomic and/or cDNA sequence data were accessed via <http://ToxoDB.org>. Genomic data were provided by the institute for genomic research (supported by NIH Grant AI05093) and by the Sanger Center (Wellcome Trust). Expressed sequence tags were generated by Washington University (NIH Grant 1R01AI045806-01A1).

References

- Akerman, S.E., and Müller, S. (2005) Peroxiredoxin-linked detoxification of hydroperoxides in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* **280**: 564–570.
- Allis, C.D., Berger, S.L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., et al. (2007) New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* **131**: 633–636.
- Briknarova, K., Zhou, X., Satterthwait, A., Hoyt, D.W., Ely, K.R., and Huang, S. (2008) Structural studies of the SET domain from RIZ1 tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun* **366**: 807–813.
- Brydges, S.D., and Carruthers, V.B. (2003) Mutation of an unusual mitochondrial targeting sequence of SODB2 produces multiple targeting fates in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* **116**: 4675–4685.
- Catterall, J.R., Sharma, S.D., and Remington, J.S. (1986) Oxygen-independent killing by alveolar macrophages. *J Exp Med* **163**: 1113–1131.
- Cui, L., Fan, Q., Cui, L., and Miao, J. (2008) Histone lysine methyltransferases and demethylases in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* **38**: 1083–1097.
- Desaint, S., Luriau, S., Aude, J.C., Rousset, G., and Toledano, M.B. (2004) Mammalian antioxidant defenses are not inducible by H₂O₂. *J Biol Chem* **279**: 31157–31163.
- Ding, M., Clayton, C., and Soldati, D. (2000) *Toxoplasma gondii* catalase: are there peroxisomes in toxoplasma? *J Cell Sci* **113**: 2409–2419.
- Ding, M., Kwok, L.Y., Schlüter, D., Clayton, C., and Soldati, D. (2004) The antioxidant systems in *Toxoplasma gondii* and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury. *Mol Microbiol* **51**: 47–61.
- Donald, R.G., Carter, D., Ullman, B., and Roos, D.S. (1996) Insertional tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl-transferase gene. Use as a selectable marker for stable transformation. *J Biol Chem* **271**: 14010–14019.
- Fulco, M., Schiltz, R.L., Iezzi, S., King, M.T., Zhao, P., Kashiwaya, Y., et al. (2003) Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell* **12**: 51–62.
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.M., Kieffer, S., Perrot, M., et al. (1998) The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 22480–22489.
- Hakimi, M.A., Deitsch, K.W. (2007) Epigenetics in Apicomplexa: control of gene expression during cell cycle progression, differentiation and antigenic variation [Review]. *Curr Opin Microbiol* **10**: 357–362.
- Halliwell, B. (2003) Oxidative stress in cell culture: an underappreciated problem? *FEBS Lett* **540**: 3–6.
- Henkle-Dührsen, K., and Kampkötter, A. (2001) Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes [Review]. *Mol Biochem Parasitol* **114**: 129–142.
- Jaiswal, A.K. (2004) Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression [Review]. *Free Radic Biol Med* **36**: 1199–1207.
- Jang, H.H., Lee, K.O., Chi, Y.H., Jung, B.G., Park, S.K., Park, J.H., et al. (2004) Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* **117**: 625–635.
- Kaasch, A.J., and Joiner, K.A. (2000) Targeting and subcellular localization of *Toxoplasma gondii* catalase. Identification of peroxisomes in an apicomplexan parasite. *J Biol Chem* **275**: 1112–1118.
- Kang, S.W., Rhee, S.G., Chang, T.S., Jeong, W., and Choi, M.H. (2005) 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications [Review]. *Trends Mol Med* **11**: 571–578.
- Kobor, M.S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M.D., Gin, J.W., Jennings, J.L., Link, A.J., et al. (2004) A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol* **2**: E131.
- Kuge, S., Jones, N., and Nomoto, A. (1997) Regulation of γ AP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J* **16**: 1710–1720.
- Lee, J.S., and Shilatifard, A. (2007) A site to remember: H3K36 methylation a mark for histone deacetylation [Review]. *Mutat Res* **618**: 130–134.
- Miller, R.A., and Britigan, B.E. (1997) Role of oxidants in microbial pathophysiology [Review]. *Clin Microbiol Rev* **10**: 1–18.
- Moldovan, G.L., Pfander, B., and Jentsch, S. (2007) PCNA, the maestro of the replication fork [Review]. *Cell* **129**: 665–679.
- Montaner, B., O'Donovan, P., Reelfs, O., Perrett, C.M., Zhang, X., Xu, Y.Z., et al. (2007) Reactive oxygen-mediated damage to a human DNA replication and repair protein. *EMBO Rep* **8**: 1074–1079.
- Moon, J.C., Hah, Y.S., Kim, W.Y., Jung, B.G., Jang, H.H., Lee, J.R., et al. (2005) Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H₂O₂-induced cell death. *J Biol Chem* **280**: 28775–28784.
- Odberg-Ferragut, C., Renault, J.P., Viscogliosi, E., Toursel, C., Briche, I., Engels, A., et al. (2000) Molecular cloning, expression analysis and iron metal cofactor characterisation of a superoxide dismutase from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* **106**: 121–129.
- Qian, C., and Zhou, M.M. (2006) SET domain protein lysine methyltransferases: structure, specificity and catalysis [Review]. *Cell Mol Life Sci* **63**: 2755–2763.
- Rodrigues-Pousada, C.A., Nevitt, T., Menezes, R., Azevedo, D., Pereira, J., and Amaral, C. (2004) Yeast activator proteins and stress response: an overview [Review]. *FEBS Lett* **567**: 80–85.
- Saksouk, N., Bhatti, M.M., Kieffer, S., Smith, A.T., Musset, K., Garin, J., et al. (2005) Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Cell Biol* **25**: 10301–10314.
- Sautel, C.F., Cannella, D., Bastien, O., Kieffer, S., Aldebert, D., Garin, J., et al. (2007) SET8-mediated methylations of histone H4 lysine 20 mark silent heterochromatic domains in apicomplexan genomes. *Mol Cell Biol* **27**: 5711–5724.
- Scacheri, P.C., Crawford, G.E., and Davis, S. (2006) Statistics for ChIP-chip and DNase hypersensitivity experiments on NimbleGen arrays. *Methods Enzymol* **411**: 270–282.

- Son, E.S., Song, K.J., Shin, J.C., and Nam, H.W. (2001) Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin from *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol* **39**: 133–141.
- Sullivan, W.J., Jr, and Hakimi, M.A. (2006) Histone mediated gene activation in *Toxoplasma gondii* [Review]. *Mol Biochem Parasitol* **148**: 109–116.
- Vandenbroucke, K., Robbens, S., Vandepoele, K., Inzé, D., Van de Peer, Y., and Van Breusegem, F. (2008) Hydrogen peroxide-induced gene expression across kingdoms: a comparative analysis. *Mol Biol Evol* **25**: 507–516.
- Wilson, C.B., Tsai, V., and Remington, J.S. (1980) Failure to trigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages: possible mechanism for survival of intracellular pathogens. *J Exp Med* **151**: 328–346.
- Wood, Z.A., Schröder, E., Robin Harris, J., and Poole, L.B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins [Review]. *Trends Biochem Sci* **28**: 32–40.
- Wood, M.J., Storz, G., and Tjandra, N. (2004) Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization. *Nature* **430**: 917–921.
- Xiao, B., Jing, C., Kelly, G., Walker, P.A., Muskett, F.W., Frenkiel, T.A., *et al.* (2005) Specificity and mechanism of the histone methyltransferase Pr-Set7. *Genes Dev* **19**: 1444–1454.
- Zheng, M., and Storz, G. (2000) Redox sensing by prokaryotic transcription factors [Review]. *Biochem Pharmacol* **59**: 1–6.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

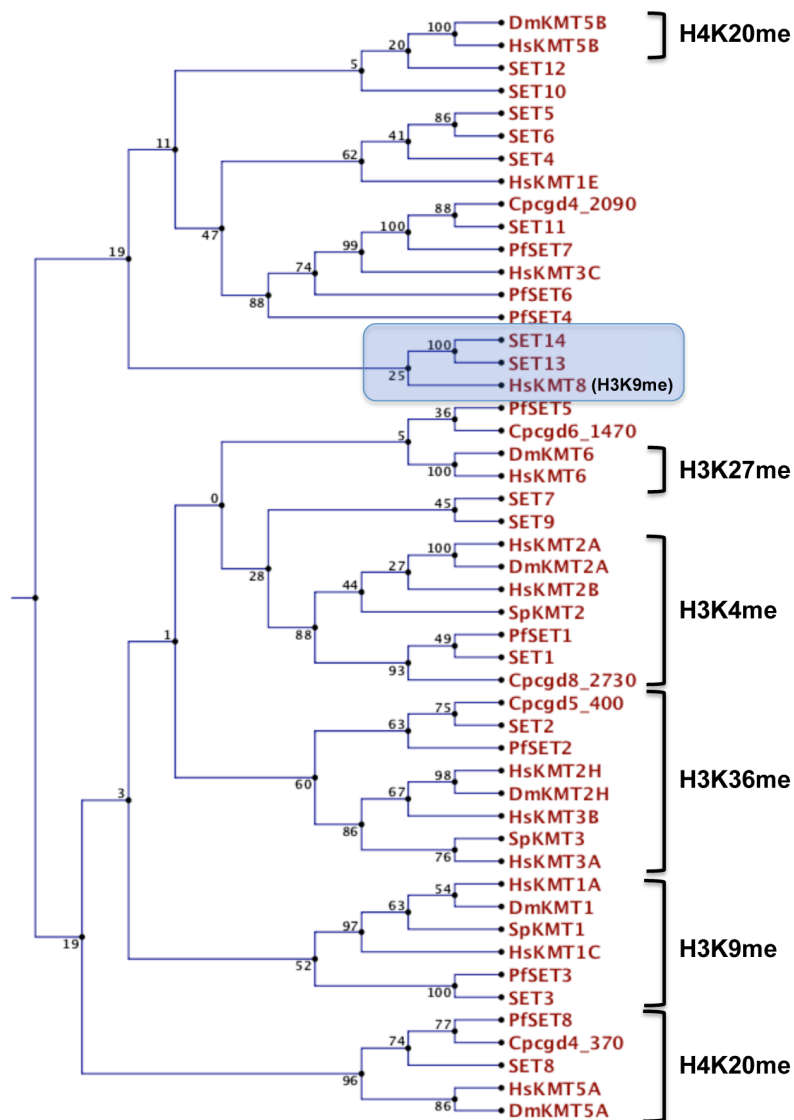


Figure S1. Phylogenetic comparison of SET-domain proteins.

Schematic dendrogram showing the relationship between some of the more characterized SET-domain proteins. *Homo sapiens* (Hs), *Drosophila melanogaster* (Dm) and *S. pombe* (Sp) lysine methyltransferases were named accordingly to the new nomenclature for chromatin-modifying enzymes (Allis *et al.*, 2007). SET13 was renamed in this paper ‘KMTox’. The tree was computed with the neighbor-joining algorithm, based on an HMM multiple alignment.

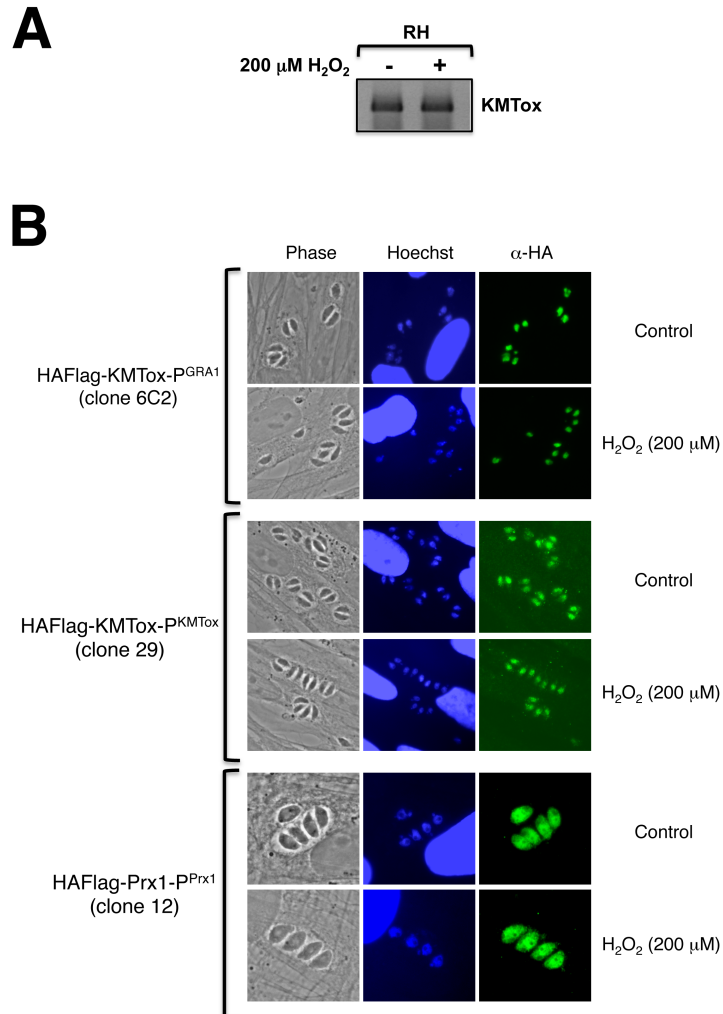


Figure S2.

A- RT-PCR was performed for KMTox gene using RNA from RH strain treated or not with hydrogen peroxide (200 μ M, 45 min). **B-** Co-staining with anti-HA (*green*) and Hoechst 33258 (*blue*) of human fibroblast cells infected with the indicated transgenic parasites treated or not 24 hours post-infection with hydrogen peroxide (200 μ M, 45 min). Exposure times are 300 ms for clones 12 and 6C2 and 5,000 ms for clone 29.

Table S1. KMTox gene targets determined by ChIP-on-chip analysis

The table indicates the genomic location of KMTox over each locus. The signal from multiple closely spaced probes will often form a peak at or near the binding site. For each peaks, the signals (selected cutoff= 3) were simply summed (Σ ratio (\log_2)) over the distance of the peak (bp). Positive (YES) or negative (NO) enrichment by control scanning ChIP is indicated. The chromosomal regions were clustered into four main DNA sequences: the exon (E), the intron (I), the upstream (5') and downstream (3') proximal regions of the predicted coding sequence according to the ToxoDB 4.3 nomenclature. n.d. : non determined.

Supporting Table 1

Gene (ToxoDB)*	Predicted Fct	Location		ChIP-on-chip Enrichment*		Scanning CHIP ***
		5'	3'	Σ ratio (log2)	Distance (bp)	
Chromatin remodeling and histone modifications						
55.m04720	KMT enzyme TgSET2	✓		10,54	378	n.d.
			✓	5,9	378	
				13,5	378	
55.m04640	KMT enzyme TgSET3		✓	6,61	214	
		✓		12,22	378	n.d.
			✓	5,99	214	
583.m05442	KMT enzyme TgSET7			7,01	460	YES
38.m02377	KMT enzyme TgSET14	✓		14,84	378	YES
74.m00425	Histone deacetylase HDAC-like		✓	25,49	870	n.d.
55.m04722	Histone deacetylase HDAC-like		✓	5,1	132	n.d.
42.m00081	Histone deacetylase TgSIR2	✓		15,6	460	YES
			✓	5,87	214	
20.m00379	Co-repressor SIN3		✓	8,9	296	n.d.
55.m04988	Co-activator ADA2-B		✓	5,75	214	n.d.
72.m00005	Chromatin factor SCRAP (SWR1 complex)		✓	9,76	460	n.d.
			✓	17,13	542	
			✓	13,24	870	
145.m00002	Histone variant H2Az (SWR1 complex)		✓	9,93	296	YES
			✓	8,93	214	
			✓	12,34	246	
55.m00071	ARP6 (SWR1 complex)		✓	15,57	378	n.d.
25.m00008	histone H2B variant 1	✓		16,96	460	n.d.
		✓		11,96	460	
80.m00091	PHD-finger domain-containing protein		✓	9	542	n.d.
20.m05907	PHD-finger domain-containing protein	✓		9,76	296	n.d.
			✓	13,99	296	
			✓	5,7	296	
76.m00006	zinc finger (C2H2 type) protein		✓	18,62	460	n.d.
583.m05434	zinc finger (C2H2 type) protein		✓	11,44	542	n.d.
20.m03835	Myb/HMG domain	✓		16,03	542	n.d.
50.m05607	ARID/BRIGHT domain	✓		9,33	1034	n.d.
			✓	9,32	214	
41.m01279	CW-type zinc finger	✓		13,12	378	n.d.
49.m03440	Zinc finger MIZ domain-containing protein 2	✓		22,08	706	n.d.
			✓	9,56	296	
			✓	17,79	460	
Transcription machinery						
50.m03314	Apicoplaste RNAP - RpoA subunit		✓	10,74	296	YES
49.m03438	RNA pol I - RPA1 subunit		✓	9,33	214	YES (weak enrichment)
			✓	6,47	214	
42.m05840	RNA pol II - RPB1 subunit		✓	11,18	378	YES
			✓	6,73	214	
			✓	7,11	214	
55.m04747	RNA pol II - RPB2 subunit		✓	11,42	296	YES
			✓	11,8	296	
			✓	6,91	460	
49.m00033	RNA pol II - RBP5 subunit		✓	9,92	296	YES
			✓	9,72	296	
			✓	12,88	378	
37.m00013	RNA pol II - RBP10 subunit		✓	13,31	378	YES (weak enrichment)
37.m00754	RNA pol III - RPC6 subunit		✓	11,81	296	YES
			✓	26,2	870	
80.m02346	TFIIB initiation factor	✓		20,15	378	NO
25.m01787	TFIIB initiation factor	✓		11,13	460	NO
			✓	9,5	214	
583.m00684	TFIIIC	✓		11,2	296	NO
			✓	5,28	214	
83.m01230	transcription elongation factor (TFIIS)	✓		7,76	214	YES (weak enrichment)
55.m04923	SPT4 elongation factor		✓	12,49	378	YES (weak enrichment)
41.m01315	SPT16/CDC68 elongation factor		✓	22,29	460	n.d.
41.m01305	TBP-binding protein ABT1	✓		10,55	378	NO
Proteins with antioxidant scavenging/defense properties						
583.m00021	Superoxide dismutase (SODB1)		✓	9,79	460	YES
			✓	16,02	542	
583.m00002	Peroxioredoxin (Prx2)	✓		10,27	296	n.d.
			✓	7,24	214	
50.m00003	Glutathione reductase (GR1)	✓		13,48	296	YES
38.m01100	Glutathione reductase (GR2)		✓	10,15	378	YES
57.m00002	Glutathione / thioredoxin peroxidase (GPx1)		✓	11,34	460	n.d.
57.m03094	Glutathione / thioredoxin peroxidase (GPx2)		✓	10,71	460	NO
			✓	17,37	378	
42.m03554	Glutaredoxin (Grx2)	✓		12,87	378	YES
83.m01245	Thioredoxin II (Trx)		✓	6,92	214	n.d.
540.m00333	Oxidoreductase		✓	11,04	296	YES
583.m05523	Oxidoreductase		✓	14,31	378	YES
59.m03597	Oxidoreductase		✓	15,31	624	n.d.
42.m00118	Oxidoreductase	✓		9,82	296	YES
			✓	6,22	378	
42.m00038	Nucleoredoxin		✓	11,38	296	YES
44.m00048	2OG-Fe(II) oxygenase family oxidoreductase	✓		9,98	378	n.d.
			✓	10,62	296	
59.m00042	Pyrroline-5-carboxylase reductase		✓	17,85	460	n.d.
59.m06112	Gamma-glutamyl phosphate reductase	✓		17,35	378	n.d.
80.m00006	malate:quinone oxidoreductase		✓	10,44	296	n.d.
38.m01108	NADPH-cytochrome p450 reductase		✓	7,29	214	n.d.
25.m00219	pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	✓		12,86	296	n.d.
25.m01796	aldo/keto reductase family oxidoreductase		✓	7,19	542	n.d.
			✓	8,3	460	
41.m01285	2OG-Fe(II) oxygenase family oxidoreductase		✓	13,08	460	n.d.

39.m00357	FAD-dependent monooxygenase	✓		9,05	214	n.d.
				14,17	378	
74.m00464	class III stress response-related ATPase	✓		14,8	378	n.d.
				11,3	460	
59.m03682	glutamine synthetase		✓	19,49	542	n.d.
641.m00003	Rar1-like protein	✓		18,72	460	n.d.
		✓		23,38	624	
			✓	12,1	378	
Heat shock and chaperone proteins						
44.m02604	cyclophilin		✓	14,88	378	n.d.
583.m05357	heat shock protein 90		✓	12,08	460	n.d.
83.m01184	heat shock protein 90	✓		17,97	430	n.d.
583.m00009	heat shock protein 70	✓		6,95	214	n.d.
59.m03611	heat shock protein HSLV		✓	9,17	296	n.d.
55.m05067	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	✓		8,75	214	n.d.
20.m00351	heat shock protein-related	✓		9,72	296	n.d.
Carbohydrate Metabolism and NADPH Regeneration						
41.m01376	Phosphoglycerate mutase (PGAM5)			14,54	296	n.d.
83.m00004	Glucose-6P dehydrogenase		✓	13,15	460	YES
			✓	28,11	706	
65.m01193	Glucose-6P dehydrogenase	✓		8,86	378	n.d.
		✓		12,28	870	
			✓	7,58	296	
44.m04690	transaldolase		✓	9,57	296	n.d.
			✓	9,49	296	
76.m00002	phosphoglucomutase		✓	8,12	296	n.d.
49.m03167	phosphomannomutase		✓	10,9	378	n.d.
547.m00082	glycerol-3-phosphate dehydrogenase		✓	15,09	624	n.d.
Protein turnover and Ubiquitin Pathway						
86.m00396	ubiquitin-conjugating enzyme E2	✓		10,95	378	n.d.
583.m00608	ubiquitin-conjugating enzyme E2		✓	16,3	378	n.d.
20.m03747	ubiquitin-conjugating enzyme E2	✓		11,6	378	n.d.
86.m00385	ubiquitin-transferase-like		✓	14,5	378	n.d.
25.m01819	ubiquitin conjugating enzyme	✓		14,32	378	n.d.
41.m01321	subtilisin-like serine protease		✓	18,37	378	n.d.
20.m05881	cullin homolog	✓		17,58	378	n.d.
Translation and RNA metabolism						
83.m01269	RNA methyltransferase, TRM4 subfamily		✓	15,88	378	n.d.
52.m01595	ribonuclease P protein subunit 2		✓	16,02	378	n.d.
27.m00872	regulator of nonsense transcripts (RENT1)	✓		15,71	460	n.d.
76.m02670	3' exoribonuclease	✓	✓	14,82	296	n.d.
49.m03108	RNA-binding protein	✓		10,82	296	n.d.
49.m03265	glutamyl-tRNA synthetase		✓	15,39	460	n.d.
			✓	12,26	296	
83.m00020	translocation protein Sec62		✓	15,66	378	n.d.
76.m02658	translation initiation factor SU11		✓	15,46	378	n.d.
49.m03359	ribosomal-protein-alanine acetyltransferase		✓	13,04	378	n.d.
72.m00843	RNA-binding protein (KH domain)		✓	18,61	460	n.d.
59.m06097	small nuclear ribonucleoprotein		✓	17,31	460	n.d.
57.m03103	mago nashi-like protein	✓		12,96	378	n.d.
80.m02342	RNA binding motif-containing protein		✓	17,71	378	n.d.
DNA repair						
55.m00160	Recombination pathway (TBPIP)	✓	✓	18,05	460	n.d.
83.m01214	DNA ligase	✓		13,17	378	n.d.
			✓	16,32	296	
			✓	7,98	214	
55.m00255	DNA primase small subunit		✓	11	296	n.d.
46.m01719	DSS1/SEM1	✓		17,78	542	n.d.
			✓	24,56	542	
50.m00004	proliferating cell nuclear antigen 1 (PCNA1)		✓	15,73	378	n.d.
Cell cycle and Signaling pathway						
55.m00233	casein kinase II alpha subunit		✓	16,84	378	n.d.
59.m00021	casein kinase II beta subunit		✓	17,08	378	n.d.
59.m03683	Signaling pathway, SPINDLY-related		✓	28,58	542	YES
86.m00397	phosphatidylinositol 3- and 4-kinase-like	✓		14,56	378	n.d.
		✓		13,54	378	
25.m00001	phosphatidylinositol synthase		✓	19,02	542	n.d.
25.m01782	PI-signaling pathway		✓	17,66	460	n.d.
52.m02687	cyclin-dependent kinase		✓	10,82	296	n.d.
641.m00185	G1 to S phase transition protein	✓	✓	18,16	460	n.d.
59.m03606	kelch motif domain-containing protein		✓	16,75	378	n.d.
Others						
641.m01568	GPI-anchored surface antigen	✓		12,34	296	n.d.
49.m03135	hypothetical protein		✓	16,4	378	n.d.
49.m03198	hypothetical protein		✓	14,6	542	n.d.
49.m00037	AMMECR1-like protein		✓	18,54	460	n.d.
74.m00764	conserved hypothetical protein		✓	22,16	460	n.d.
55.m04690	hypothetical protein	✓		15,38	378	n.d.
44.m02724	hypothetical protein		✓	19,68	460	n.d.
59.m07782	hypothetical protein	✓		18,74	378	n.d.
42.m03601	hypothetical protein		✓	20,42	378	n.d.

* The TOXODB4.2 (Toxoplasma genome resource) gene identifier is provided for the T.gondii ME49 strain

** Cutoff = 3

TOXOPLASMA GONDII GENE EXPRESSION IS UNDER THE CONTROL OF REGULATORY PATHWAYS ACTING THROUGH CHROMATIN STRUCTURE

BOUGDOUR A.***, SAUTEL C.F.***, CANNELLA D.***, BRAUN L.***, & HAKIMI M.A.***

Summary:

The activity state of a gene is determined by a complex regulatory network of co-acting factors affecting the structure of the chromatin into which the gene is embedded. While significant changes of the transcriptome occur during cell differentiation in apicomplexan parasites, basic mechanisms controlling gene expression are still unknown. Recent studies support and expand the concept of the chromatin environment being key factor for the control of transcriptional activity in these lower eukaryotes organisms. Here, we review recent advances in the field of epigenetic gene regulation in *Toxoplasma gondii*, the model apicomplexan.

KEY WORDS : Apicomplexa, *Toxoplasma gondii*, chromatin, transcription, epigenetics.

Apicomplexa is a phylum of unicellular parasites that includes important human pathogens like *Plasmodium* species, the causative agents of the dreadful malaria, and *Toxoplasma gondii*, the common cause of congenital toxoplasmosis and severe encephalitis in immunocompromised individuals. Apicomplexan parasites undergo differentiation into several physiologically and morphologically distinct forms. Upon ingestion of *T. gondii* cysts, the tachyzoites (fast replicative form) go through several rounds of host cell invasion and replication. In response to the host immune response, slow growing bradyzoites form cysts in the tissues of the infected host. This form can revert to the rapidly dividing tachyzoite in immunocompromised individuals. Although, the molecular basis for this developmental switch is still unknown, the process of stage conversion is associated with dramatic changes of the pattern of gene expression (Radke *et al.*, 2005). In addition, transcriptomic and proteomic analysis allowed the identification of many stage specific genes (Radke *et al.*, 2005; TOXODB, proteomics data from J.M. Wastling). Therefore, the transcriptional activity of the genome must be regulated differentially by an undefined mechanism.

* Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Micro-organismes, Université Joseph Fourier Grenoble 1, BP 170, F-38042 Grenoble cedex 9, France.

** CNRS UMR 5163 – ATIP+ group.

Correspondence: Mohamed-Ali Hakimi.

Tel.: 33 (0)4 76 63 74 69 – Fax: 33 (0)4 76 63 74 97.

E-mail: Mohamed-Ali.Hakimi@ujf-grenoble.fr

The control of gene expression is regulated in a highly organized fashion to ensure that specific genes are expressed at the appropriate times and levels to maintain cell homeostasis. In all eukaryotes, gene expression is controlled at multiple levels. First, promoter regions are packaged into chromatin, which regulates promoter accessibility. Second, sequence-specific DNA binding proteins (*i.e.* Transcriptional Factors, TFs) orchestrate the remodeling of chromatin and the recruitment of the transcription machinery. Third, general (or basal) transcription initiation factors (GTFs) such as TFIIA, -B, -D, -E, -F, -H and RNA polymerase II (pol II) assemble into a transcription pre-initiation complex (PIC). Fourth, pol II and associated elongation factors produce an RNA transcript. Apicomplexan genomes reveal a primitive eukaryotic transcription apparatus composed of a limited subset of the general transcription factors found in higher eukaryotes (Callebaut *et al.*, 2005; Meissner & Soldati, 2005; Iyer *et al.*, 2007). Intriguingly, no specific transcription factors were found so far in *Apicomplexa* and none of the well-characterized transcription regulators operating in other eukaryotes can be found by sequence comparison (Sullivan & Hakimi, 2006; Iyer *et al.*, 2007). However, even though we cannot rule out the existence of unconventional TFs (Balaji *et al.*, 2005), it is becoming apparent that an abundance of chromatin remodeling machineries are present (Hakimi & Deitsch, 2007; Iyer *et al.*, 2007). Thus, we hypothesized that *Apicomplexa* rely predominantly on epigenetic mechanisms to modulate chromatin structure and consequently its activity (Sullivan & Hakimi, 2006).

In eukaryotes, the DNA molecule is packed with different proteins especially by histone proteins to form nucleosome. The packaging of the DNA into nucleosomes affect all stages of transcription from PIC formation to elongation by restricting physically the accessibility of the DNA sequence to regulatory proteins or transcription apparatus. This restriction is dynamic and changes during differentiation or in response to exogenous cues. The nucleosome is a dynamic unit tightly regulated by various protein complexes. They are displaced at promoters during gene activation in a process that involves ATP-dependent nucleosome remo-

deling complexes, histone variants and a variety of histone modifications. Indeed, the relatively unstructured histone “tail” domains are evolutionarily conserved, exposed on the nucleosomal surface and subjected to a dizzying array of post-translational modifications, such as serine and threonine phosphorylation, lysine acetylation, lysine and arginine methylation, lysine ubiquitination and sumoylation, and ADP-ribosylation (for review Strahl & Allis, 2000; Kouzarides, 2007). Covalent modifications of histones, both in the tails and in the globular cores, regulate the packaging of genomic DNA into chromatin, gene activity and other functions of the genome. Emerging evidences suggest that a histone modification work alone or in combinatorial fashion on the same tail (cis) or on distinct tails (trans) to contribute to the so-called “histone code” (Strahl & Allis, 2000). Regardless of position or function, these covalent marks have been found to be dynamic and controlled by the opposing actions of various enzymes for their addition and removal (for recent review, see Kouzarides, 2007).

Considerable recent attention has focused on the molecular links between changes in parasite chromatin structure and the subsequent gene regulation. Most of our understanding about the role played by histone modifications in gene expression in *Apicomplexa* comes from studies on *P. falciparum* and *T. gondii*. The variety of histone modifications and the corresponding enzymatic systems that create or maintain them have been reviewed extensively in recent literature (Hakimi & Deitsch, 2007; Sullivan & Hakimi, 2006). The bulk of this review focuses on the influence of histone modifications on transcription in *T. gondii*, but it must be kept in mind that ATP-dependant chromatin remodeling activities (Sullivan & Hakimi, 2006) and histone variants (Sullivan *et al.*, 2006) also play critical roles in regulation of parasite gene expression.

A NEW MAP FOR NAVIGATING THE *TOXOPLASMA* EPIGENOME

What did we learn so far in *T. gondii*? Like other eukaryotes, the parasite chromosomes display a typical nucleosomal organization involving both canonical and variant histones (Sullivan *et al.*, 2006). Many of the histone residues covalently modified in human or yeast cells are remarkably well conserved in *T. gondii* and are subject to similar modifications (Fig. 1). Besides, some of these marks on histone have been shown to have evolutionarily conserved roles in transcription regulation (Saksouk *et al.*, 2005; Sullivan & Hakimi, 2006; Sullivan *et al.*, 2006; Gissot *et al.*, 2007).

Physical maps describing the exact position of each modified histone on the genome provides an invaluable

tool to analyze its complex regulatory circuits involved in the gene expression. Such information is determined by the chromatin immunoprecipitation (ChIP) technology (Robyr *et al.*, 2002). Theoretically, the use of appropriate antibodies, allows the localization on the genome of either non-histone or histone proteins carrying or not specific covalent modifications. In *T. gondii*, ChIP assay was used for the first time to study histone acetylation, one of the most prominent modifications in the *T. gondii* gene expression (Saksouk *et al.*, 2005; Bhatti *et al.*, 2006). The pattern of histone acetylation correlates precisely with gene activity of the promoters analyzed in tachyzoite and bradyzoite cells. In *T. gondii*, as in other eukaryotic organisms, acetylation is a mark of gene activation (Saksouk *et al.*, 2005, Fig. 1B). Moreover, long-range histone acetylation patterns spanning many kilobases contribute to coordinate transcription of stage-specific tandemly arrayed multi-gene clusters (Saksouk *et al.*, 2005; Gissot *et al.*, 2007). In heterochromatin, the transcription of genes is usually repressed, whereas genes in euchromatin are usually active. Interestingly, in the same fashion as in other studied organisms, *T. gondii* heterochromatin regions are surrounded by short regions (hundreds of base pairs) of chromatin with high-level of histone acetylation (Sautel *et al.*, 2007). The biological meaning of this observation is still unknown but it was found that deacetylated histone-containing sites are associated with a reduced level of expression of the neighboring genes, suggesting a polar effect of these epigenetic modifications on the surrounding genes (*e.g.* bradyzoite-specific BSR4-related genes, Saksouk *et al.*, 2005; Gissot *et al.*, 2007). Thus, several coexpressed genes are clustered into eu- or heterochromatin domains, which suggest that chromatin, can be further divided into separate domains. Possibly, histone deacetylation sites may serve as partition borders for chromatin domains and affect gene expression. This mechanism may facilitate the coregulation of large subset of genes during differentiation or other cell processes.

In addition to histone acetylation, H3R17me2 and H3K4me3 methylations have been attributed to parasite gene activation (Saksouk *et al.*, 2005; Gissot *et al.*, 2007; Fig. 1B). Recent data has pointed out a central role of mono-, di- and trimethylated H4K20 and H3K9 in heterochromatin-mediated gene silencing (Sautel *et al.*, 2007). Also, the phosphorylation of serine 10 on histone H3 – a conserved epigenetic mark of mitosis – and H4K20me1 correlate perfectly with chromosome condensation during *T. gondii* tachyzoite division (Sautel *et al.*, 2007). These marks could signify the presence of epigenetic memory during the *T. gondii* life-cycle. More recent advances in ChIP technology have made possible to analyze genome-wide chromatin characteristics in eukaryotic cells. Global patterns of histone modifications are observed by combining the specifi-

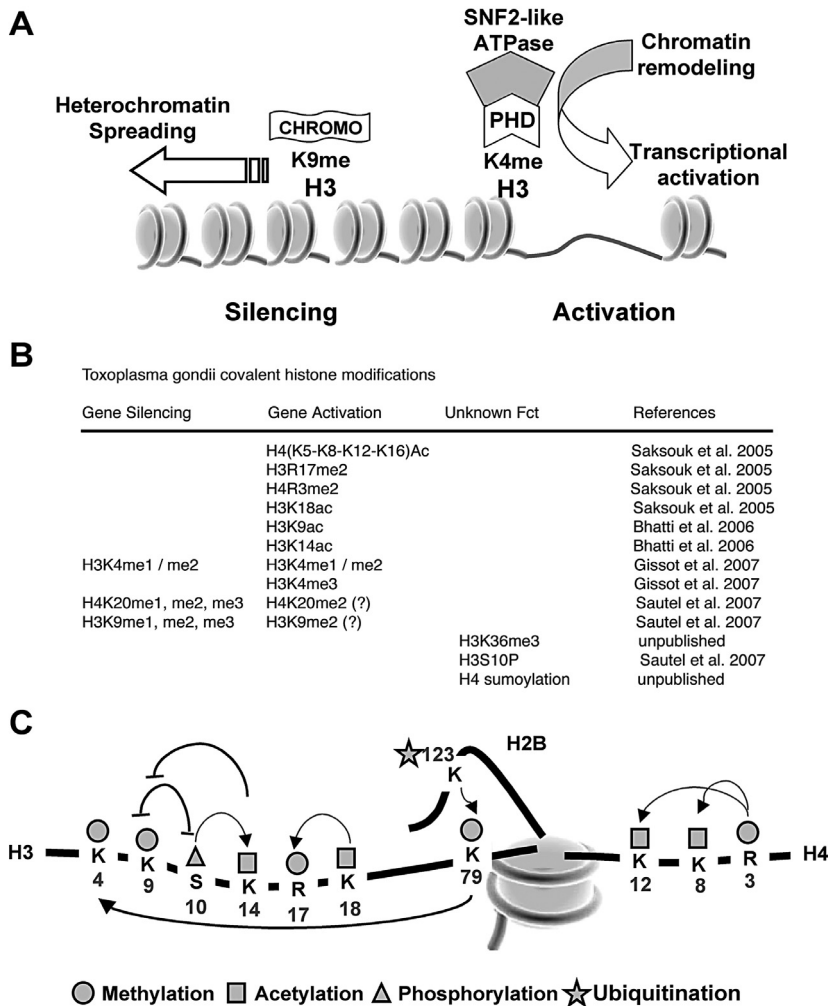


Fig. 1. – Chromatin modifications and their functions in *T. gondii*. (A) Gene expression alterations are brought by the recruitment of co-repressor (left side) or co-activator (right side) complexes, which contain specific “reading” domains recognizing repressive and active marks, respectively. (B) Overview of different covalent histone modifications identified in *T. gondii* so far. (C) Crosstalk between histone modifications. The positive or the negative influence of histone modifications are shown by an arrow or by a dish line, respectively. Adapted from Kouzarides T. (2007).

city of chromatin immunoprecipitation with the unbiased, high-throughput capabilities of microarrays (ChIP-on-chip; Robyr *et al.*, 2002). Applied to *T. gondii*, ChIP-on-chip analyses [genome-wide (Sautel *et al.*, 2007) or on a tiling arrays encompassing a 0.65-Mb contiguous portion of the chromosome 1b (Gissot *et al.*, 2007)] reveal that several modifications co-localize at precise loci and correlate either with significant gene expression or gene silencing. In the same manner as mentioned above, we observed at certain loci, that contiguous sets of genes were coregulated. The underlying mechanism of such regulation is currently unknown, but possibly, the presence of enhancer regions in the vicinity of the acetylated histones is required. At other loci, the effect of neighboring modifications may be reduced by histone deacetylation preventing the distal enhancers from accessing the promoter (unpublished data). The combination of data from genome-wide histone modifications and mRNA expression profiling may provide an integrated picture of the genome and epigenome of *T. gondii*. The identified binding sites may be used as a basis for annotating functional elements in genomes, including promoters, enhancers, silencing elements, insu-

lators, and boundary elements. ChIP-on-chip data may be used as a basis for re-annotating the predicted genome. Gissot *et al.* (2005) discovered transcripts in regions where genes are not predicted by looking for the enrichment of active marks. So far, such genome-wide data were generated using tachyzoite chromatin for immunoprecipitation and not bradyzoite or other specific conditions. It is therefore impossible to draw a clear-cut interpretation about the physiological functions of the histone modifications throughout the parasite life cycle. Understanding the overall mechanisms by which histone modifications control gene expression in *Apicomplexa* should contribute to identify subset of genes directly involved in the control of stage conversion. Analysis of the entire genome with high-resolution maps of modified histones combined with transcriptional data should help to understand the physiological state of cells at specific stages of the life cycle and predict its commitments. Transcription of multiple genes may be achieved by a single developmental event triggering a cascade of gene expressions. Still the robustness and buffering of determined epigenetic networks need to be tested. This could also be done to some extent by interfering with

the enzymes in charge of the ‘code’ writing. In other words, can we target pharmacologically chromatin-remodeling activity to treat Toxoplasmosis?

CHROMATIN MODIFYING ENZYMES: THE *T. GONDII* ACHILLES’ HEEL?

There is an extensive but still largely unexplored repertoire of proteins predicted to modify histones in the *T. gondii* genome (Sullivan & Hakimi, 2006). The marks can be placed and removed by a variety of site-specific enzymes such as histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs), histone methyltransferases (HMTs) and histone demethylases, and so on.

The histone deacetylases play a major role in keeping the balance between the acetylated and deacetylated states of chromatin, thereby controlling gene expression. Inhibitors of HDACs (HDACi) are under considerable exploration, in part because of their potential roles in reversing the silenced genes in transformed tumor cells by modulating transcriptional processes (Xu *et al.*, 2007). HDACi are now emerging as an interesting new class of antiprotozoal agent. Indeed, apicidin, a fungal metabolite, has broad-spectrum activity against the *apicomplexan* parasites, presumably via inhibition of protozoan histone deacetylases, and demonstrates efficacy against *Plasmodium berghei* malaria in mice (Darkin-Rattray *et al.*, 1996). The use of different class of HDACi is valuable to study the cause-and-effect relationship between histone acetylation and gene activity in *T. gondii*. Theoretically, each HDACi having a noticeable effect on global levels of histone acetylation could be used to determine the impact of the different histone modifications on chromatin activity during stage-conversion. A prerequisite for such studies is to determine whether each parasite HDACs identified are direct targets for such inhibitors.

The class of methyltransferase enzymes are other key players in the regulation of chromatin modelling and activity, thereby expanding the variety of regulatory mechanisms (Kouzarides, 2007). The monomethyl mark on lysine 20 of histone H4 correlates with intracellular levels of the methyltransferase TgSet8 throughout cell cycle, suggesting that this enzyme controls and is regulated through the developmental cycle of *T. gondii* (Sautel *et al.*, 2007). Also, H3R17 dimethylation was detected as a mark of gene activation in *Toxoplasma*, during both tachyzoite and bradyzoite stages. Attempts to generate a knockout clone of TgCARM1, which dimethylated H3R17, have been unsuccessful. Pretreatment of parasites with an inhibitor of TgCARM1 prior to infection of host cells increased the frequency of bradyzoite conversion, suggesting that the H3R17me2

mark is involved in the control of the tachyzoite to bradyzoite differentiation process (Saksouk *et al.*, 2005). Altogether, these data indicate that methyltransferase family of proteins has essential biological functions in *Apicomplexa*. Despite the increasing number of evidences demonstrating the important role played by histone modifying enzymes, very little is known about the mechanisms controlling their target specificities and functions in shaping the epigenome and orchestrating the development program of the parasite. At term, interfering with the ‘writing’ would end up with unraveling how active domains in chromatin are generated and altered during *T. gondii* stage transition.

THE “HISTONE CODE” READERS

Histone modifications are thought to constitute a “histone code” that is used by the cell to encrypt various chromatin conformations and thereby, gene expression states. A clear correlation between certain modification of histones and DNA packaging in either active or inactive chromatin is conserved in *T. gondii*. In strong support to the histone code hypothesis, cross talk between marks on one or multiple histone tails was reported in *T. gondii*. Methylation of H3R17 was concurrent with acetylation of H3K18, suggesting a possible dual signature for gene activation (Saksouk *et al.*, 2005; Fig. 1C). In contrast, the selective enrichment of distinct H3K9 and H4K20 methylations with genes whose transcription is repressed support the presence of a H4K20 and H3K9 trans-tail histone code in the parasite (Sautel *et al.*, 2007). Fundamentally, still remains to be determined the biological significance of each covalent modification in *Apicomplexa*. Accumulating evidences suggest that these modifications act as selective binding platforms for recruiting specific regulatory proteins at the proper place and specific time; the histone code readers. Thus, numerous transcriptional regulators have domains that are capable of recognizing specific histone modifications. Among such readers are proteins with bromodomains (BROMO) that recognizes acetylated lysines, proteins with chromodomains (CHROMO) that recognized methylated residues, proteins with plant homeodomains (PHD) finger and tudor domains that bind methylated histones (Kouzarides, 2007; Fig. 1A). Sequence comparison analysis revealed that *T. gondii* has several uncharacterized genes encoding for BROMO-, CHROMO- and PHD-containing proteins (Hakimi & Deitsch, 2007; Iyer *et al.*, 2007). As in other organisms, many of these domains are found within parasite chromatin-modifying enzymes themselves, such as HAT, HMT and ATP-dependent remodeling enzymes. Still needs to be addressed how each domain reads the parasite dialect and transduces the epigenetic information into a cellular response.

FUTURES DIRECTIONS

Epigenetic information contained in chromatin is a fascinating feature used by cells to modulate and extend the genetic code. As mentioned above, we have attempted to lay out the current state of knowledge on chromatin-dependent gene expression in *T. gondii*. In a not-so-distant future, we will decipher the complete transcriptional regulatory codes for *T. gondii* and construct blueprints for the initiation and maintenance of complex cellular processes, including parasite proliferation and differentiation.

Attention needs to be focused on the specific targeting of the chromatin remodeling enzymes to gene loci which has been shown to be mediated in part by DNA-binding transcription factors in other organisms. The relative paucity of such factors in the *Apicomplexa* phylum must imply an alternative targeting mechanism. How are the modifying enzymes recruited to specific DNA sequences? Noncoding RNAs participate by a still unknown mechanism in the control of epigenetic regulation and chromosomal dynamics such as gene silencing by RNA interference (RNAi), dosage compensation or imprinting (Zaratiegui *et al.*, 2007). It is therefore possible that non-coding RNAs provide the missing link in understanding the specific targeting of chromatin modifying and/or remodeling complexes to the proper chromosomal locations. While only a few conventional DNA-binding factors are found in *Apicomplexa*, a recent genome wide search suggests that a significant number of noncoding RNAs are present (Radke *et al.*, 2005; Hakimi & Deitsch, 2007). Small RNAs could target differentially modified histone proteins to specific loci, which could organize in return the genome into stretches of active and silent transcriptional regions.

ACKNOWLEDGEMENTS

Dr Hakimi MA is supported by grants from ANR (MIME Program), CNRS (ATIP+ Program) and INSERM (Contrat Interface).

REFERENCES

- BALAJI S., BABU M.M., IYER L.M. & ARAVIND L. Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains. *Nucleic Acids Res.*, 2005, 33 (13), 3994-4006.
- BHATTI M.M., LIVINGSTON M., MULLAPUDI N. & SULLIVAN W.J. Jr. Pair of unusual GCN5 histone acetyltransferases and ADA2 homologues in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5 (1), 62-76.
- CALLEBAUT I., PRAT K., MEURICE E., MORNON J.P. & TOMAVO S. Prediction of the general transcription factors associated with RNA polymerase II in *Plasmodium falciparum*: conserved features and differences relative to other eukaryotes. *BMC Genomics*, 2005, 23, 6-100.
- DARKIN-RATTRAY S.J. *et al.* Apicidin: a novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93 (23), 13143-13147.
- GISSOT M., KELLY K.A., AJIOKA J.W., GREALLY J.M. & KIM K. Epigenomic modifications predict active promoters and gene structure in *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.*, 2007, 3 (6), 77.
- HAKIMI M.A. & DEITSCH K.W. Epigenetics in Apicomplexa: control of gene expression during cell cycle progression, differentiation and antigenic variation. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2007, 10 (4), 357-362.
- IYER L.M., ANANTHARAMAN V., WOLF M.Y. & ARAVIND L. Comparative genomics of transcription factors and chromatin proteins in parasitic protists and other eukaryotes. *Int. J. Parasitol.*, 2007, Sep. 15 [Epub ahead of print].
- KOUZARIDES T. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 2007, 128 (4), 693-705.
- MEISSNER M. & SOLDATI D. The transcription machinery and the molecular toolbox to control gene expression in *Toxoplasma gondii* and other protozoan parasites. *Microbes Infect.*, 2005, 7 (13), 1376-1384.
- RADKE J.R., BEHNKE M.S., MACKAY A.J., RADKE J.B., ROOS D.S. & WHITE M.W. The transcriptome of *Toxoplasma gondii*. *BMC Biol.*, 2005, 2, 3-26.
- ROBYR D., SUKA Y., XENARIOS I., KURDISTANI S.K., WANG A., SUKA N. & GRUNSTEIN M. Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell*, 2002, 109 (4), 437-446.
- SAKSOUK N., BHATTI M.M., KIEFFER S., SMITH A.T., MUSSET K., GARIN J., SULLIVAN W.J. JR, CESBRON-DELAUW M.F. & HAKIMI M.A. Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Cell Biol.*, 2005, 25 (23), 10301-10314.
- SAUTEL C.F., CANNELLA D., BASTIEN O., KIEFFER S., ALDEBERT D., GARIN J., TARDIEUX I., BELRHALI H., & HAKIMI M.A. SET8-mediated methylations of histone H4 lysine 20 mark silent heterochromatic domains in apicomplexan genomes. *Mol. Cell Biol.*, 2007, 27 (16), 5711-5724.
- STRAHL B.D. & ALLIS C.D. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000, 403 (6765), 41-45.
- SULLIVAN W.J. Jr & HAKIMI M.A. Histone mediated gene activation in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2006, 148 (2), 109-116.
- SULLIVAN W.J. Jr, NAGULESWARAN A. & ANGEL S.O. Histones and histone modifications in protozoan parasites. *Cell. Microbiol.*, 2006, 8 (12), 1850-1861.
- XU W.S., PARMIGIANI R.B. & MARKS P.A. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, 2007, 26, 5541-5452.
- ZARATIEGUI M., IRVINE D.V. & MARTIENSSEN R.A. Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell*, 2007, 128 (4), 763-776.

- Akerman, S.E., Muller, S., 2005. Peroxiredoxin-linked detoxification of hydroperoxides in *Toxoplasma gondii*. The Journal of biological chemistry 280, 564-570.
- Allshire, R.C., Nimmo, E.R., Ekwall, K., Javerzat, J.P., Cranston, G., 1995. Mutations derepressing silent centromeric domains in fission yeast disrupt chromosome segregation. Genes & development 9, 218-233.
- Andrulis, E.D., Neiman, A.M., Zappulla, D.C., Sternglanz, R., 1998. Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. Nature 394, 592-595.
- Annunziato, A.T., Hansen, J.C., 2000. Role of histone acetylation in the assembly and modulation of chromatin structures. Gene expression 9, 37-61.
- Bae, Y.S., Sung, J.Y., Kim, O.S., Kim, Y.J., Hur, K.C., Kazlauskas, A., Rhee, S.G., 2000. Platelet-derived growth factor-induced H₂O₂ production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. The Journal of biological chemistry 275, 10527-10531.
- Balaji, S., Babu, M.M., Iyer, L.M., Aravind, L., 2005. Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains. Nucleic acids research 33, 3994-4006.
- Bannister, A.J., Kouzarides, T., 1996. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. Nature 384, 641-643.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., Kouzarides, T., 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. Nature 410, 120-124.
- Barranco-Medina, S., Kakorin, S., Lazaro, J.J., Dietz, K.J., 2008. Thermodynamics of the dimer-decamer transition of reduced human and plant 2-cys peroxiredoxin. Biochemistry 47, 7196-7204.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., Zhao, K., 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. Cell 129, 823-837.
- Baylin, S.B., Herman, J.G., 2000. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. Trends Genet 16, 168-174.
- Behnke, M.S., Radke, J.B., Smith, A.T., Sullivan, W.J., Jr., White, M.W., 2008. The transcription of bradyzoite genes in *Toxoplasma gondii* is controlled by autonomous promoter elements. Molecular microbiology 68, 1502-1518.
- Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., 3rd, Gingeras, T.R., Schreiber, S.L., Lander, E.S., 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. Cell 120, 169-181.
- Bernstein, E., Hake, S.B., 2006. The nucleosome: a little variation goes a long way. Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire 84, 505-517.
- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P., 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. Biochimica et biophysica acta 1758, 994-1003.
- Black, M.W., Boothroyd, J.C., 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiol Mol Biol Rev 64, 607-623.
- Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U., 1993. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. Infection and immunity 61, 1141-1145.
- Bosch-Driessen, L.H., Plaisier, M.B., Stilma, J.S., Van der Lelij, A., Rothova, A., 2002. Reactivations of ocular toxoplasmosis after cataract extraction. Ophthalmology 109, 41-45.

- Boucher, I.W., McMillan, P.J., Gabrielsen, M., Akerman, S.E., Brannigan, J.A., Schnick, C., Brzozowski, A.M., Wilkinson, A.J., Muller, S., 2006. Structural and biochemical characterization of a mitochondrial peroxiredoxin from *Plasmodium falciparum*. *Molecular microbiology* 61, 948-959.
- Bougdour, A., Sautel, C.F., Cannella, D., Braun, L., Hakimi, M.A. 2008. *Toxoplasma gondii* gene expression is under the control of regulatory pathways acting through chromatin structure. *Parasite*. 15(3):206-10. Review.
- Brydges, S.D., Carruthers, V.B., 2003. Mutation of an unusual mitochondrial targeting sequence of SODB2 produces multiple targeting fates in *Toxoplasma gondii*. *Journal of cell science* 116, 4675-4685.
- Buxton, D., Innes, E.A., 1995. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology* 110 Suppl, S11-16.
- Buxton, D., 1998. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Veterinary research* 29, 289-310.
- Cairns, B.R., 2007. Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies. *Nature structural & molecular biology* 14, 989-996.
- Callebaut, I., Prat, K., Meurice, E., Mornon, J.P., Tomavo, S., 2005. Prediction of the general transcription factors associated with RNA polymerase II in *Plasmodium falciparum*: conserved features and differences relative to other eukaryotes. *BMC genomics* 6, 100.
- Cao, R., Zhang, Y., 2004. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Current opinion in genetics & development* 14, 155-164.
- Caporaletti, D., D'Alessio, A.C., Rodriguez-Suarez, R.J., Senn, A.M., Duek, P.D., Wolosiuk, R.A., 2007. Non-reductive modulation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by 2-Cys peroxiredoxin. *Biochemical and biophysical research communications* 355, 722-727.
- Caretti, G., Di Padova, M., Micales, B., Lyons, G.E., Sartorelli, V., 2004. The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes & development* 18, 2627-2638.
- Carruthers, V., Boothroyd, J.C., 2007. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Current opinion in microbiology* 10, 83-89.
- Cerutti, P.A., 1985. Prooxidant states and tumor promotion. *Science (New York, N.Y)* 227, 375-381.
- Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., Bahler, J., 2003. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Molecular biology of the cell* 14, 214-229.
- Chen, Z., Zang, J., Whetstine, J., Hong, X., Davrazou, F., Kutateladze, T.G., Simpson, M., Mao, Q., Pan, C.H., Dai, S., Hagman, J., Hansen, K., Shi, Y., Zhang, G., 2006. Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members. *Cell* 125, 691-702.
- Cheung, P., Tanner, K.G., Cheung, W.L., Sassone-Corsi, P., Denu, J.M., Allis, C.D., 2000. Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Molecular cell* 5, 905-915.
- Chookajorn, T., Dzikowski, R., Frank, M., Li, F., Jiwani, A.Z., Hartl, D.L., Deitsch, K.W., 2007. Epigenetic memory at malaria virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 899-902.

- Chuang, Y.Y., Chen, Y., Gadiseti, Chandramouli, V.R., Cook, J.A., Coffin, D., Tsai, M.H., DeGraff, W., Yan, H., Zhao, S., Russo, A., Liu, E.T., Mitchell, J.B., 2002. Gene expression after treatment with hydrogen peroxide, menadione, or t-butyl hydroperoxide in breast cancer cells. *Cancer research* 62, 6246-6254.
- Claiborne, A., Mallett, T.C., Yeh, J.I., Luba, J., Parsonage, D., 2001. Structural, redox, and mechanistic parameters for cysteine-sulfenic acid function in catalysis and regulation. *Advances in protein chemistry* 58, 215-276.
- Cleary, M.D., Singh, U., Blader, I.J., Brewer, J.L., Boothroyd, J.C., 2002. *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. *Eukaryotic cell* 1, 329-340.
- Cosgrove, M.S., Wolberger, C., 2005. How does the histone code work? *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 83, 468-476.
- Cosma, M.P., Tanaka, T., Nasmyth, K., 1999. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* 97, 299-311.
- Couture, J.F., Collazo, E., Brunzelle, J.S., Trievel, R.C., 2005. Structural and functional analysis of SET8, a histone H4 Lys-20 methyltransferase. *Genes & development* 19, 1455-1465.
- Cui, L., Fan, Q., Cui, L., Miao, J., 2008. Histone lysine methyltransferases and demethylases in *Plasmodium falciparum*. *International journal for parasitology* 38, 1083-1097.
- Cuthbert, G.L., Daujat, S., Snowden, A.W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P.D., Tempst, P., Bannister, A.J., Kouzarides, T., 2004. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118, 545-553.
- Dalmasso, M.C., Echeverria, P.C., Zappia, M.P., Hellman, U., Dubremetz, J.F., Angel, S.O., 2006. *Toxoplasma gondii* has two lineages of histones 2b (H2B) with different expression profiles. *Molecular and biochemical parasitology* 148, 103-107.
- Dalton, T.P., Shertzer, H.G., Puga, A., 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual review of pharmacology and toxicology* 39, 67-101.
- Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J., Mittler, R., 2005. The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 139, 847-856.
- De Lay, N.R., Cronan, J.E., 2007. In vivo functional analyses of the type II acyl carrier proteins of fatty acid biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 282, 20319-20328.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J., Toledano, M.B., 2002. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111, 471-481.
- Demple, B., Sung, J.S., 2005. Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair. *DNA repair* 4, 1442-1449.
- Denkers, E.Y., Kim, L., Butcher, B.A., 2003. In the belly of the beast: subversion of macrophage proinflammatory signalling cascades during *Toxoplasma gondii* infection. *Cellular microbiology* 5, 75-83.
- Deponte, M., Rahlfs, S., Becker, K., 2007. Peroxiredoxin systems of protozoal parasites. *Subcellular biochemistry* 44, 219-229.
- Desaint, S., Luriau, S., Aude, J.C., Rousset, G., Toledano, M.B., 2004. Mammalian antioxidant defenses are not inducible by H₂O₂. *The Journal of biological chemistry* 279, 31157-31163.

- Ding, M., Kwok, L.Y., Schluter, D., Clayton, C., Soldati, D., 2004. The antioxidant systems in *Toxoplasma gondii* and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury. *Molecular microbiology* 51, 47-61.
- Donald, R.G., Carter, D., Ullman, B., Roos, D.S., 1996. Insertional tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. Use as a selectable marker for stable transformation. *The Journal of biological chemistry* 271, 14010-14019.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C.A., 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical microbiology reviews* 11, 267-299.
- Dubremetz, J.F., Garcia-Reguet, N., Conseil, V., Fourmaux, M.N., 1998. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol* 28, 1007-1013.
- Duraisingh, M.T., Voss, T.S., Marty, A.J., Duffy, M.F., Good, R.T., Thompson, J.K., Freitas-Junior, L.H., Scherf, A., Crabb, B.S., Cowman, A.F., 2005. Heterochromatin silencing and locus repositioning linked to regulation of virulence genes in *Plasmodium falciparum*. *Cell* 121, 13-24.
- Fan, H.Y., He, X., Kingston, R.E., Narlikar, G.J., 2003. Distinct strategies to make nucleosomal DNA accessible. *Molecular cell* 11, 1311-1322.
- Fang, J., Feng, Q., Ketel, C.S., Wang, H., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Simon, J.A., Zhang, Y., 2002. Purification and functional characterization of SET8, a nucleosomal histone H4-lysine 20-specific methyltransferase. *Curr Biol* 12, 1086-1099.
- Ferguson, D., 2002. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends in parasitology* 18, 351.
- Ferguson, D.J., 2004. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *International journal for parasitology* 34, 347-360.
- Feuerbach, F., Galy, V., Trelles-Sticken, E., Fromont-Racine, M., Jacquier, A., Gilson, E., Olivo-Marin, J.C., Scherthan, H., Nehrbass, U., 2002. Nuclear architecture and spatial positioning help establish transcriptional states of telomeres in yeast. *Nature cell biology* 4, 214-221.
- Fichera, M.E., Roos, D.S., 1997. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* 390, 407-409.
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
- Frank, S.R., Schroeder, M., Fernandez, P., Taubert, S., Amati, B., 2001. Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes & development* 15, 2069-2082.
- Freitas-Junior, L.H., Hernandez-Rivas, R., Ralph, S.A., Montiel-Condado, D., Ruvalcaba-Salazar, O.K., Rojas-Meza, A.P., Mancio-Silva, L., Leal-Silvestre, R.J., Gontijo, A.M., Shorte, S., Scherf, A., 2005. Telomeric heterochromatin propagation and histone acetylation control mutually exclusive expression of antigenic variation genes in malaria parasites. *Cell* 121, 25-36.
- Frescas, D., Guardavaccaro, D., Bassermann, F., Koyama-Nasu, R., Pagano, M., 2007. JHDM1B/FBXL10 is a nucleolar protein that represses transcription of ribosomal RNA genes. *Nature* 450, 309-313.
- Gangaraju, V.K., Bartholomew, B., 2007. Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling. *Mutation research* 618, 3-17.

- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O., 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular biology of the cell* 11, 4241-4257.
- Gazzinelli, R.T., Amichay, D., Sharton-Kersten, T., Grunwald, E., Farber, J.M., Sher, A., 1996. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol* 219, 127-139.
- Girardot, F., Monnier, V., Tricoire, H., 2004. Genome wide analysis of common and specific stress responses in adult drosophila melanogaster. *BMC genomics* 5, 74.
- Gissot, M., Choi, S.W., Thompson, R.F., Grealley, J.M., Kim, K., 2008. *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum* lack detectable DNA cytosine methylation. *Eukaryotic cell* 7, 537-540.
- Gladyshev, E., Meselson, M., 2008. Extreme resistance of bdelloid rotifers to ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 5139-5144.
- Gordon, J.L., Beatty, W.L., Sibley, L.D., 2008. A novel actin-related protein is associated with daughter cell formation in *Toxoplasma*. *Eukaryotic cell*.
- Grewal, S.I., Elgin, S.C., 2007. Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* 447, 399-406.
- Grewal, S.I., Jia, S., 2007. Heterochromatin revisited. *Nature reviews* 8, 35-46.
- Grummt, I., Pikaard, C.S., 2003. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 641-649.
- Grummt, I., Ladurner, A.G., 2008. A metabolic throttle regulates the epigenetic state of rDNA. *Cell* 133, 577-580.
- Guillemette, B., Bataille, A.R., Gevry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F., Gaudreau, L., 2005. Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS biology* 3, e384.
- Hakimi, M.A., Deitsch, K.W., 2007. Epigenetics in Apicomplexa: control of gene expression during cell cycle progression, differentiation and antigenic variation. *Current opinion in microbiology* 10, 357-362.
- Halliwell, B., 2003. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS letters* 540, 3-6.
- Hermann, A., Gowher, H., Jeltsch, A., 2004. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 61, 2571-2587.
- Houston, S.I., McManus, K.J., Adams, M.M., Sims, J.K., Carpenter, P.B., Hendzel, M.J., Rice, J.C., 2008. Catalytic Function of the PR-Set7 Histone H4 Lysine 20 Methyltransferase Is Essential for Mitotic Entry and Genomic Stability. *The Journal of biological chemistry* 283, 19478-19488.
- Huang, Y., Fang, J., Bedford, M.T., Zhang, Y., Xu, R.M., 2006. Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science (New York, N.Y)* 312, 748-751.
- Huen, M.S., Grant, R., Manke, I., Minn, K., Yu, X., Yaffe, M.B., Chen, J., 2007. RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell* 131, 901-914.
- Huen, M.S., Sy, S.M., van Deursen, J.M., Chen, J., 2008. Direct interaction between SET8 and proliferating cell nuclear antigen couples H4-K20 methylation with DNA replication. *The Journal of biological chemistry* 283, 11073-11077.

- Hughes, H.P., 1988. Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. *Parasitology today* (Personal ed 4, 340-347).
- Hyland, E.M., Cosgrove, M.S., Molina, H., Wang, D., Pandey, A., Cottee, R.J., Boeke, J.D., 2005. Insights into the role of histone H3 and histone H4 core modifiable residues in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 25, 10060-10070.
- Immenschuh, S., Baumgart-Vogt, E., Tan, M., Iwahara, S., Ramadori, G., Fahimi, H.D., 2003. Differential cellular and subcellular localization of heme-binding protein 23/peroxiredoxin I and heme oxygenase-1 in rat liver. *J Histochem Cytochem* 51, 1621-1631.
- Iyer, L.M., Anantharaman, V., Wolf, M.Y., Aravind, L., 2008. Comparative genomics of transcription factors and chromatin proteins in parasitic protists and other eukaryotes. *International journal for parasitology* 38, 1-31.
- Jenuwein, T., 2001. Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends in cell biology* 11, 266-273.
- Jenuwein, T., Allis, C.D., 2001. Translating the histone code. *Science* (New York, N.Y) 293, 1074-1080.
- Jeppesen, P., Turner, B.M., 1993. The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* 74, 281-289.
- Jones, J.L., Hanson, D.L., Chu, S.Y., Ciesielski, C.A., Kaplan, J.E., Ward, J.W., Navin, T.R., 1996. Toxoplasmic encephalitis in HIV-infected persons: risk factors and trends. The Adult/Adolescent Spectrum of Disease Group. *AIDS* (London, England) 10, 1393-1399.
- Jonsson, T.J., Johnson, L.C., Lowther, W.T., 2008. Structure of the sulphiredoxin-peroxiredoxin complex reveals an essential repair embrace. *Nature* 451, 98-101.
- Jorgensen, S., Elvers, I., Trelle, M.B., Menzel, T., Eskildsen, M., Jensen, O.N., Helleday, T., Helin, K., Sorensen, C.S., 2007. The histone methyltransferase SET8 is required for S-phase progression. *The Journal of cell biology* 179, 1337-1345.
- Julien, E., Herr, W., 2004. A switch in mitotic histone H4 lysine 20 methylation status is linked to M phase defects upon loss of HCF-1. *Molecular cell* 14, 713-725.
- Kang, S.W., Rhee, S.G., Chang, T.S., Jeong, W., Choi, M.H., 2005. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trends in molecular medicine* 11, 571-578.
- Karachentsev, D., Sarma, K., Reinberg, D., Steward, R., 2005. PR-Set7-dependent methylation of histone H4 Lys 20 functions in repression of gene expression and is essential for mitosis. *Genes & development* 19, 431-435.
- Karagiannis, J., Young, P.G., 2001. Intracellular pH homeostasis during cell-cycle progression and growth state transition in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of cell science* 114, 2929-2941.
- Kato, M., Kato, S., Abe, Y., Nishino, T., Ohama, E., Aoki, M., Itoyama, Y., 2006. Histological recovery of the hepatocytes is based on the redox system upregulation in the animal models of mutant superoxide dismutase (SOD)1-linked amyotrophic lateral sclerosis. *Histology and histopathology* 21, 729-742.
- Kato, S., Kato, M., Abe, Y., Matsumura, T., Nishino, T., Aoki, M., Itoyama, Y., Asayama, K., Awaya, A., Hirano, A., Ohama, E., 2005. Redox system expression in the motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS, superoxide dismutase 1 (SOD1)-mutated familial ALS, and SOD1-mutated ALS animal models. *Acta neuropathologica* 110, 101-112.

- Khan, A.U., Hampsey, M., 2002. Connecting the DOTs: covalent histone modifications and the formation of silent chromatin. *Trends Genet* 18, 387-389.
- Kim, T., Buratowski, S., 2007. Two *Saccharomyces cerevisiae* JmjC domain proteins demethylate histone H3 Lys36 in transcribed regions to promote elongation. *The Journal of biological chemistry* 282, 20827-20835.
- Kingston, R.E., Narlikar, G.J., 1999. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes & development* 13, 2339-2352.
- Kobayashi, M., Ishizuka, T., Katayama, M., Kanehisa, M., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Pakrasi, H.B., Ikeuchi, M., 2004. Response to oxidative stress involves a novel peroxiredoxin gene in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant & cell physiology* 45, 290-299.
- Kouzarides, T., 2002. Histone methylation in transcriptional control. *Current opinion in genetics & development* 12, 198-209.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Kurdistani, S.K., Grunstein, M., 2003. Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 276-284.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., Jenuwein, T., 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116-120.
- Lacoste, N., Utley, R.T., Hunter, J.M., Poirier, G.G., Cote, J., 2002. Disruptor of telomeric silencing-1 is a chromatin-specific histone H3 methyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 277, 30421-30424.
- LaCount, D.J., Vignali, M., Chettier, R., Phansalkar, A., Bell, R., Hesselberth, J.R., Schoenfeld, L.W., Ota, I., Sahasrabudhe, S., Kurschner, C., Fields, S., Hughes, R.E., 2005. A protein interaction network of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 438, 103-107.
- Langermans, J.A., Van der Hulst, M.E., Nibbering, P.H., Hiemstra, P.S., Fransen, L., Van Furth, R., 1992. IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 148, 568-574.
- Latham, J.A., Dent, S.Y., 2007. Cross-regulation of histone modifications. *Nature structural & molecular biology* 14, 1017-1024.
- Lee, J.M., Calkins, M.J., Chan, K., Kan, Y.W., Johnson, J.A., 2003. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *The Journal of biological chemistry* 278, 12029-12038.
- Lee, M.G., Wynder, C., Cooch, N., Shiekhatar, R., 2005. An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature* 437, 432-435.
- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A.A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., Peters, A.H., 2003. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* 13, 1192-1200.
- Lekutis, C., Ferguson, D.J., Grigg, M.E., Camps, M., Boothroyd, J.C., 2001. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *International journal for parasitology* 31, 1285-1292.
- Li, B., Pattenden, S.G., Lee, D., Gutierrez, J., Chen, J., Seidel, C., Gerton, J., Workman, J.L., 2005. Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18385-18390.

- Li, B., Carey, M., Workman, J.L., 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707-719.
- Li, H., Singh, A.K., McIntyre, L.M., Sherman, L.A., 2004. Differential gene expression in response to hydrogen peroxide and the putative PerR regulon of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of bacteriology* 186, 3331-3345.
- Litt, M.D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C.D., Felsenfeld, G., 2001. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science (New York, N.Y.)* 293, 2453-2455.
- Lo, W.S., Gamache, E.R., Henry, K.W., Yang, D., Pillus, L., Berger, S.L., 2005. Histone H3 phosphorylation can promote TBP recruitment through distinct promoter-specific mechanisms. *The EMBO journal* 24, 997-1008.
- Lo, Y.Y., Cruz, T.F., 1995. Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *The Journal of biological chemistry* 270, 11727-11730.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Lyons, R.E., McLeod, R., Roberts, C.W., 2002. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends in parasitology* 18, 198-201.
- Margueron, R., Trojer, P., Reinberg, D., 2005. The key to development: interpreting the histone code? *Current opinion in genetics & development* 15, 163-176.
- Martin, C., Zhang, Y., 2007. Mechanisms of epigenetic inheritance. *Current opinion in cell biology* 19, 266-272.
- Matsumura, T., Okamoto, K., Iwahara, S., Hori, H., Takahashi, Y., Nishino, T., Abe, Y., 2008. Dimer-oligomer interconversion of wild-type and mutant rat 2-Cys peroxiredoxin: disulfide formation at dimer-dimer interfaces is not essential for decamerization. *The Journal of biological chemistry* 283, 284-293.
- Meier, B., Radeke, H.H., Selle, S., Younes, M., Sies, H., Resch, K., Habermehl, G.G., 1989. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *The Biochemical journal* 263, 539-545.
- Meissner, M., Soldati, D., 2005. The transcription machinery and the molecular toolbox to control gene expression in *Toxoplasma gondii* and other protozoan parasites. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 7, 1376-1384.
- Mele, A., Paterson, P.J., Prentice, H.G., Leoni, P., Kibbler, C.C., 2002. Toxoplasmosis in bone marrow transplantation: a report of two cases and systematic review of the literature. *Bone marrow transplantation* 29, 691-698.
- Mellone, B.G., Ball, L., Suka, N., Grunstein, M.R., Partridge, J.F., Allshire, R.C., 2003. Centromere silencing and function in fission yeast is governed by the amino terminus of histone H3. *Curr Biol* 13, 1748-1757.
- Messina, D.N., Glasscock, J., Gish, W., Lovett, M., 2004. An ORFeome-based analysis of human transcription factor genes and the construction of a microarray to interrogate their expression. *Genome research* 14, 2041-2047.
- Metzger, E., Wissmann, M., Yin, N., Muller, J.M., Schneider, R., Peters, A.H., Gunther, T., Buettner, R., Schule, R., 2005. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 437, 436-439.
- Militello, K.T., Patel, V., Chessler, A.D., Fisher, J.K., Kasper, J.M., Gunasekera, A., Wirth, D.F., 2005. RNA polymerase II synthesizes antisense RNA in *Plasmodium falciparum*. *RNA (New York, N.Y.)* 11, 365-370.
- Montoya, J.G., Liesenfeld, O., 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965-1976.

- Moon, J.C., Hah, Y.S., Kim, W.Y., Jung, B.G., Jang, H.H., Lee, J.R., Kim, S.Y., Lee, Y.M., Jeon, M.G., Kim, C.W., Cho, M.J., Lee, S.Y., 2005. Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H₂O₂-induced cell death. *The Journal of biological chemistry* 280, 28775-28784.
- Mordue, D.G., Scott-Weathers, C.F., Tobin, C.M., Knoll, L.J., 2007. A patatin-like protein protects *Toxoplasma gondii* from degradation in activated macrophages. *Molecular microbiology* 63, 482-496.
- Mortensen, P.B., Norgaard-Pedersen, B., Waltoft, B.L., Sorensen, T.L., Hougaard, D., Torrey, E.F., Yolken, R.H., 2007. *Toxoplasma gondii* as a risk factor for early-onset schizophrenia: analysis of filter paper blood samples obtained at birth. *Biological psychiatry* 61, 688-693.
- Mostertz, J., Scharf, C., Hecker, M., Homuth, G., 2004. Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression in response to superoxide and peroxide stress. *Microbiology (Reading, England)* 150, 497-512.
- Mu, Z.M., Yin, X.Y., Prochownik, E.V., 2002. Pag, a putative tumor suppressor, interacts with the Myc Box II domain of c-Myc and selectively alters its biological function and target gene expression. *The Journal of biological chemistry* 277, 43175-43184.
- Murray, H.W., Szuro-Sudol, A., Wellner, D., Oca, M.J., Granger, A.M., Libby, D.M., Rothermel, C.D., Rubin, B.Y., 1989. Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages. *Infection and immunity* 57, 845-849.
- Murray, J.I., Whitfield, M.L., Trinklein, N.D., Myers, R.M., Brown, P.O., Botstein, D., 2004. Diverse and specific gene expression responses to stresses in cultured human cells. *Molecular biology of the cell* 15, 2361-2374.
- Nakayama, T., Watanabe, M., Suzuki, H., Toyota, M., Sekita, N., Hirokawa, Y., Mizokami, A., Ito, H., Yatani, R., Shiraishi, T., 2000. Epigenetic regulation of androgen receptor gene expression in human prostate cancers. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 80, 1789-1796.
- Nash, P.B., Purner, M.B., Leon, R.P., Clarke, P., Duke, R.C., Curiel, T.J., 1998. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J Immunol* 160, 1824-1830.
- Naumann, K., Fischer, A., Hofmann, I., Krauss, V., Phalke, S., Irmeler, K., Hause, G., Aurich, A.C., Dorn, R., Jenuwein, T., Reuter, G., 2005. Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in *Arabidopsis*. *The EMBO journal* 24, 1418-1429.
- Neely, K.E., Hassan, A.H., Brown, C.E., Howe, L., Workman, J.L., 2002. Transcription activator interactions with multiple SWI/SNF subunits. *Molecular and cellular biology* 22, 1615-1625.
- Neill, S., Desikan, R., Hancock, J., 2002. Hydrogen peroxide signalling. *Current opinion in plant biology* 5, 388-395.
- Nishi, M., Hu, K., Murray, J.M., Roos, D.S., 2008. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *Journal of cell science* 121, 1559-1568.
- O'Carroll, D., Erhardt, S., Pagani, M., Barton, S.C., Surani, M.A., Jenuwein, T., 2001. The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Molecular and cellular biology* 21, 4330-4336.
- Oakley, M.S., Kumar, S., Anantharaman, V., Zheng, H., Mahajan, B., Haynes, J.D., Moch, J.K., Fairhurst, R., McCutchan, T.F., Aravind, L., 2007. Molecular factors and

- biochemical pathways induced by febrile temperature in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* parasites. *Infection and immunity* 75, 2012-2025.
- Pavri, R., Zhu, B., Li, G., Trojer, P., Mandal, S., Shilatifard, A., Reinberg, D., 2006. Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell* 125, 703-717.
- Peters, A.H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M., Jenuwein, T., 2001. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107, 323-337.
- Peters, A.H., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R.J., Derijck, A.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., Martens, J.H., Jenuwein, T., 2003. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Molecular cell* 12, 1577-1589.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29, e45.
- Pijnappel, W.W., Schaft, D., Roguev, A., Shevchenko, A., Tekotte, H., Wilm, M., Rigaut, G., Seraphin, B., Aasland, R., Stewart, A.F., 2001. The *S. cerevisiae* SET3 complex includes two histone deacetylases, Hos2 and Hst1, and is a meiotic-specific repressor of the sporulation gene program. *Genes & development* 15, 2991-3004.
- Pino, P., Foth, B.J., Kwok, L.Y., Sheiner, L., Schepers, R., Soldati, T., Soldati-Favre, D., 2007. Dual targeting of antioxidant and metabolic enzymes to the mitochondrion and the apicoplast of *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens* 3, e115.
- Polo, S.E., Almouzni, G., 2006. Chromatin assembly: a basic recipe with various flavours. *Current opinion in genetics & development* 16, 104-111.
- Probst, A.V., Almouzni, G., 2008. Pericentric heterochromatin: dynamic organization during early development in mammals. *Differentiation; research in biological diversity* 76, 15-23.
- Rabilloud, T., Heller, M., Gasnier, F., Luche, S., Rey, C., Aebersold, R., Benahmed, M., Louisot, P., Lunardi, J., 2002. Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site. *The Journal of biological chemistry* 277, 19396-19401.
- Racki, L.R., Narlikar, G.J., 2008. ATP-dependent chromatin remodeling enzymes: two heads are not better, just different. *Current opinion in genetics & development* 18, 137-144.
- Radke, J.R., Striepen, B., Guerini, M.N., Jerome, M.E., Roos, D.S., White, M.W., 2001. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology* 115, 165-175.
- Radke, J.R., Behnke, M.S., Mackey, A.J., Radke, J.B., Roos, D.S., White, M.W., 2005. The transcriptome of *Toxoplasma gondii*. *BMC biology* 3, 26.
- Rai, K., Nadauld, L.D., Chidester, S., Manos, E.J., James, S.R., Karpf, A.R., Cairns, B.R., Jones, D.A., 2006. Zebra fish Dnmt1 and Suv39h1 regulate organ-specific terminal differentiation during development. *Molecular and cellular biology* 26, 7077-7085.
- Rando, O.J., 2007. Global patterns of histone modifications. *Current opinion in genetics & development* 17, 94-99.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., Jenuwein, T., 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593-599.
- Rhee, S.G., 1999. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Experimental & molecular medicine* 31, 53-59.

- Rice, J.C., Allis, C.D., 2001. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Current opinion in cell biology* 13, 263-273.
- Rice, J.C., Nishioka, K., Sarma, K., Steward, R., Reinberg, D., Allis, C.D., 2002. Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes & development* 16, 2225-2230.
- Roos, D.S., Donald, R.G., Morrissette, N.S., Moulton, A.L., 1994. Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Methods in cell biology* 45, 27-63.
- Ruthenburg, A.J., Li, H., Patel, D.J., Allis, C.D., 2007. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 983-994.
- Saeij, J.P., Collier, S., Boyle, J.P., Jerome, M.E., White, M.W., Boothroyd, J.C., 2007. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* 445, 324-327.
- Sakaguchi, A., Steward, R., 2007. Aberrant monomethylation of histone H4 lysine 20 activates the DNA damage checkpoint in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of cell biology* 176, 155-162.
- Saksouk, N., Bhatti, M.M., Kieffer, S., Smith, A.T., Musset, K., Garin, J., Sullivan, W.J., Jr., Cesbron-Delauw, M.F., Hakimi, M.A., 2005. Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Molecular and cellular biology* 25, 10301-10314.
- Sanders, S.L., Portoso, M., Mata, J., Bahler, J., Allshire, R.C., Kouzarides, T., 2004. Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* 119, 603-614.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J., Kouzarides, T., 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407-411.
- Sarma, K., Reinberg, D., 2005. Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 139-149.
- Sautel, C.F., Cannella, D., Bastien, O., Kieffer, S., Aldebert, D., Garin, J., Tardieux, I., Belrhali, H., Hakimi, M.A., 2007. SET8-mediated methylations of histone H4 lysine 20 mark silent heterochromatic domains in apicomplexan genomes. *Molecular and cellular biology* 27, 5711-5724.
- Sautel, C.F., Ortet, P., Saksouk, N., Kieffer, S., Garin, J., Bastien, O., Hakimi, M.A., 2008. The histone methylase KMTox interacts with the redox-sensor peroxiredoxin-1 and targets genes involved in *Toxoplasma gondii* antioxidant defences. *Molecular Microbiology* in press.
- Schones, D.E., Zhao, K., 2008. Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nature reviews* 9, 179-191.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R., Reuter, G., 2002. Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *The EMBO journal* 21, 1121-1131.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., Jenuwein, T., 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes & development* 18, 1251-1262.
- Seksek, O., Bolard, J., 1996. Nuclear pH gradient in mammalian cells revealed by laser microspectrofluorimetry. *Journal of cell science* 109 (Pt 1), 257-262.

- Sher, A., Oswald, I.P., Hieny, S., Gazzinelli, R.T., 1993. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 150, 3982-3989.
- Shi, X., Kachirskaja, I., Yamaguchi, H., West, L.E., Wen, H., Wang, E.W., Dutta, S., Appella, E., Gozani, O., 2007. Modulation of p53 function by SET8-mediated methylation at lysine 382. *Molecular cell* 27, 636-646.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., Shi, Y., 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.
- Shrestha, S.P., Tomita, T., Weiss, L.M., Orlofsky, A., 2006. Proliferation of *Toxoplasma gondii* in inflammatory macrophages in vivo is associated with diminished oxygen radical production in the host cell. *International journal for parasitology* 36, 433-441.
- Sibley, L.D., Andrews, N.W., 2000. Cell invasion by un-palatable parasites. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 1, 100-106.
- Sienkiewicz, N., Daher, W., Dive, D., Wrenger, C., Viscogliosi, E., Wintjens, R., Jouin, H., Capron, M., Muller, S., Khalife, J., 2004. Identification of a mitochondrial superoxide dismutase with an unusual targeting sequence in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology* 137, 121-132.
- Sims, J.K., Houston, S.I., Magazinnik, T., Rice, J.C., 2006. A trans-tail histone code defined by monomethylated H4 Lys-20 and H3 Lys-9 demarcates distinct regions of silent chromatin. *The Journal of biological chemistry* 281, 12760-12766.
- Singh, U., Brewer, J.L., Boothroyd, J.C., 2002. Genetic analysis of tachyzoite to bradyzoite differentiation mutants in *Toxoplasma gondii* reveals a hierarchy of gene induction. *Molecular microbiology* 44, 721-733.
- Son, E.S., Song, K.J., Shin, J.C., Nam, H.W., 2001. Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin from *Toxoplasma gondii*. *The Korean journal of parasitology* 39, 133-141.
- Stanley Kim, H., Yu, Y., Snesrud, E.C., Moy, L.P., Linford, L.D., Haas, B.J., Nierman, W.C., Quackenbush, J., 2005. Transcriptional divergence of the duplicated oxidative stress-responsive genes in the Arabidopsis genome. *Plant J* 41, 212-220.
- Strahl, B.D., Allis, C.D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Sullivan, W.J., Jr., 2003. Histone H3 and H3.3 variants in the protozoan pathogens *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii*. *DNA Seq* 14, 227-231.
- Sullivan, W.J., Jr., Hakimi, M.A., 2006. Histone mediated gene activation in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology* 148, 109-116.
- Sun, Z.W., Allis, C.D., 2002. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 418, 104-108.
- Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Irani, K., Finkel, T., 1995. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science (New York, N.Y)* 270, 296-299.
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H., Kato, H., Shinkai, Y., 2002. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes & development* 16, 1779-1791.
- Talasz, H., Lindner, H.H., Sarg, B., Helliger, W., 2005. Histone H4-lysine 20 monomethylation is increased in promoter and coding regions of active genes and

- correlates with hyperacetylation. *The Journal of biological chemistry* 280, 38814-38822.
- Tardat, M., Murr, R., Herceg, Z., Sardet, C., Julien, E., 2007. PR-Set7-dependent lysine methylation ensures genome replication and stability through S phase. *The Journal of cell biology* 179, 1413-1426.
- Taverna, S.D., Coyne, R.S., Allis, C.D., 2002. Methylation of histone h3 at lysine 9 targets programmed DNA elimination in tetrahymena. *Cell* 110, 701-711.
- Taverna, S.D., Li, H., Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., Patel, D.J., 2007. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nature structural & molecular biology* 14, 1025-1040.
- Templeton, T.J., Iyer, L.M., Anantharaman, V., Enomoto, S., Abrahante, J.E., Subramanian, G.M., Hoffman, S.L., Abrahamsen, M.S., Aravind, L., 2004. Comparative analysis of apicomplexa and genomic diversity in eukaryotes. *Genome research* 14, 1686-1695.
- Tenter, A.M., Heckerth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International journal for parasitology* 30, 1217-1258.
- Torrey, E.F., Bartko, J.J., Lun, Z.R., Yolken, R.H., 2007. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in patients with schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophrenia bulletin* 33, 729-736.
- Tsukada, Y., Zhang, Y., 2006. Purification of histone demethylases from HeLa cells. *Methods (San Diego, Calif)* 40, 318-326.
- Vakoc, C.R., Sachdeva, M.M., Wang, H., Blobel, G.A., 2006. Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin. *Molecular and cellular biology* 26, 9185-9195.
- Van Breusegem, F., Dat, J.F., 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant physiology* 141, 384-390.
- Van, T.T., Kim, S.K., Camps, M., Boothroyd, J.C., Knoll, L.J., 2007. The BSR4 protein is up-regulated in *Toxoplasma gondii* bradyzoites, however the dominant surface antigen recognised by the P36 monoclonal antibody is SRS9. *International journal for parasitology* 37, 877-885.
- Vandenbroucke, K., Robbens, S., Vandepoele, K., Inze, D., Van de Peer, Y., Van Breusegem, F., 2008. Hydrogen peroxide-induced gene expression across kingdoms: a comparative analysis. *Molecular biology and evolution* 25, 507-516.
- Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Gruissem, W., Inze, D., Van Breusegem, F., 2005. Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant physiology* 139, 806-821.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M.A., Bassett, D.E., Jr., Hieter, P., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1997. Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* 88, 243-251.
- Volkel, P., Angrand, P.O., 2007. The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie* 89, 1-20.
- Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y.H., Perlin, J.R., Leonelli, L., Sonbuchner, L.S., McDonald, C.H., Cook, R.G., Dou, Y., Roeder, R.G., Clarke, S., Stallcup, M.R., Allis, C.D., Coonrod, S.A., 2004. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination. *Science (New York, N.Y)* 306, 279-283.
- Wen, S.T., Van Etten, R.A., 1997. The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity. *Genes & development* 11, 2456-2467.

- Wilson, R.J., Williamson, D.H., 1997. Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 1-16.
- Wolffe, A.P., Hayes, J.J., 1999. Chromatin disruption and modification. *Nucleic acids research* 27, 711-720.
- Wood, M.J., Storz, G., Tjandra, N., 2004. Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization. *Nature* 430, 917-921.
- Wood, Z.A., Poole, L.B., Hantgan, R.R., Karplus, P.A., 2002. Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry* 41, 5493-5504.
- Wood, Z.A., Poole, L.B., Karplus, P.A., 2003a. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science (New York, N.Y)* 300, 650-653.
- Wood, Z.A., Schroder, E., Robin Harris, J., Poole, L.B., 2003b. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in biochemical sciences* 28, 32-40.
- Xiao, B., Jing, C., Kelly, G., Walker, P.A., Muskett, F.W., Frenkiel, T.A., Martin, S.R., Sarma, K., Reinberg, D., Gambin, S.J., Wilson, J.R., 2005. Specificity and mechanism of the histone methyltransferase Pr-Set7. *Genes & development* 19, 1444-1454.
- Yin, Y., Yu, V.C., Zhu, G., Chang, D.C., 2008. SET8 plays a role in controlling G1/S transition by blocking lysine acetylation in histone through binding to H4 N-terminal tail. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 7, 1423-1432.
- Zanton, S.J., Pugh, B.F., 2006. Full and partial genome-wide assembly and disassembly of the yeast transcription machinery in response to heat shock. *Genes & development* 20, 2250-2265.
- Zhang, H., Roberts, D.N., Cairns, B.R., 2005. Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* 123, 219-231.
- Zhang, Y., Reinberg, D., 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & development* 15, 2343-2360.
- Zhang, Y.W., Halonen, S.K., Ma, Y.F., Wittner, M., Weiss, L.M., 2001. Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. *Infection and immunity* 69, 501-507.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A., Storz, G., 2001. DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *Journal of bacteriology* 183, 4562-4570.

Abréviations

APE : Endonuclease AP
ARNr : ARN ribosomiques
BCxxx : Tampon à 20 mM Tris-HCl pH8 ; 0.2 mM EDTA, 10% glycerol et xxx mM KCl
CARM1 : coactivator-associated arginine methyltransferase 1
ChIP : chromatin immunoprécipitation
ChIP on Chip : immunoprécipitation de la chromatine couplée à une hybridation sur puce à ADN de tout le génome.
Cystéine Cp : Cystéine peroxidatic
Cystéine Cr : Cystéine resolving
Ct : cycle threshold
CV : volume de colonne
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTT : Dithiothreitol
Gpx3 : glutathione peroxidase 3
HA : haemaglutinine epitope tag
HAT : histone acetyltransferase
HDAC : histone desacetylase
HFF : Human Foreskin Fibroblast
H4K20 : Lysine 20 de l'histone H4 (IDEM pour les autres histones et autres résidus)
HMG : High Mobility Group
HMT : Histone MeThyltransferase
HP1 : Heterochromatin Protein 1
HXGPRT : Hypoxanthine Xanthine Guanine PhosphoRibosyl Transferase
IP : ImmunoPrécipitation
JHDM : JmjC domain containing histone demethylase
KDa : KiloDalton
KMT : histone lysine methyltransferase
KMTox : TgSET13
NES : Nuclear Export Signal
NLS : Nuclear Localisation Signal
PBS : Phosphate Buffered Saline
PIC : PreInitiation Complex
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR : polymerase chain reaction
PolII : ARN Polymerase II
Prx1 : Peroxiredoxine 1
QChIP : ChIP couplée à une analyse par PCR quantitative en temps réel
SAM : S-adenosyl-methionine
SAGE : Serial Analysis of Gene Expression
Scanning ChIP : ChIP couplée à une analyse par PCR avec des amorces spécifiques
SET: Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax
Sir : silent information regulator protein
SUV39H1 : SUppressor of Variegation 3-9 Homologue 1
SVF : Serum de Veau Foetal
TBP : TATA box binding protein
TBE : Tris borate EDTA
FTs : Facteurs de Transcription Spécifiques
TTBS : Twen Tris Buffer Saline
TSA : Trichloroacetic Acid Solution
WT : wild type
Yap1 : Yes-associated protein 1

RESUME

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire qui appartient au phylum des Apicomplexa. Il est l'agent pathogène de la toxoplasmose. Ce parasite opportuniste est responsable de la toxoplasmose cérébrale chez les individus immunodéprimés et le fœtus. L'interconversion du parasite de la forme tachyzoïte virulente à la forme bradyzoïte quiescente est au centre de la pathogénèse de cette infection. Ce processus repose sur une régulation fine de l'expression des gènes. Des études suggèrent un contrôle transcriptionnel de l'interconversion avec l'expression exclusive de certains gènes dans un stade donné de différenciation parasitaire. Cependant, ce parasite et son phylum se distinguent des autres eucaryotes par un nombre limité de facteurs spécifiques de transcription. Nous avons émis l'hypothèse que le niveau d'expression des gènes de *Toxoplasma gondii* est étroitement régulé par la structure physique et la nature chimique de la chromatine. Au début de ma thèse, peu de choses étaient connues sur le remodelage de la chromatine chez *Toxoplasma gondii*. L'ensemble de nos résultats et ceux d'autres équipes, convergent vers l'idée de l'existence d'un « code histone parasitaire » hautement sophistiqué. Pendant ma thèse, nous avons identifié et caractérisé une histone lysine méthyltransférase de la famille de SET8 responsable de la méthylation de H4K20. Le rôle de H4K20-me dans la stabilité du génome est considérée comme une fonction apparue précocement dans l'évolution tandis que son rôle dans l'hétérochromatine est considérée comme une fonction apparue plus tardivement avec la complexification des génomes. Chez *Toxoplasma gondii*, TgSET8 est capable de mono-, di-, et trimétyler H4K20 ; ce qui la distingue de son homologue humain SET8 qui catalyse exclusivement la monométhylation. La différence d'activité entre les deux enzymes semble reposer sur un seul résidu du site catalytique. TgSET8 et sa marque H4K20-me1 sont régulées au cours du cycle cellulaire et localisent au niveau des régions d'hétérochromatine péricentriques et télomériques chez *T. gondii* et *P. falciparum*. L'ensemble de nos résultats montrent que la fonction de SET8 et H4K20 dans l'hétérochromatine n'est pas restreinte aux métazoaires. Nous avons également étudié le rôle de KMTox, une autre histone lysine-méthyltransférase de *Toxoplasma gondii*. Localisée dans le noyau, elle possède un domaine HMG capable de se lier à l'ADN. Cette enzyme catalyse la méthylation des histones H4 et H2A *in vitro*, avec une augmentation de l'activité en conditions réductrices. KMTox interagit spécifiquement avec une 2-cys peroxiredoxine-1 typique et l'interaction semble être favorisée en condition oxydative. Parmi d'autres fonctions cellulaires, KMTox semble réguler majoritairement les gènes impliqués dans la réponse antioxydante et le maintien de l'homéostasie cellulaire. Elle pourrait réguler l'expression des gènes chez *Toxoplasma gondii* par la mise en place d'un remodelage rapide de régions chromatiniennes et contribuer à la mise en place de la réponse antioxydante via son interaction avec le senseur redox TgPrx1.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an intracellular parasite that belongs Apicomplexa phylum. This pathogen is responsible for toxoplasmosis. This opportunistic parasite causes cerebral toxoplasmosis in immunodepressed individuals and the fetus. Interconversion from the virulent tachyzoite form of the parasite to its quiescent bradyzoite form is a critical point in the pathogenesis. This process involves a tiny regulation of the gene expression. Previous studies suggest a transcriptional control of interconversion, including a stage specific expression of genes. However, this parasite and the whole phylum Apicomplexa are characterized by the presence of few specific transcription factors. We hypothesized that the level of genes expression in *Toxoplasma gondii* is finely regulated by physical structure and chemical nature of chromatin. When I started my PhD, very few was known about chromatin remodeling in *Toxoplasma*. Today, our results and others results, lead to the idea of the existence of a highly sophisticated "parasitic histone code". During my PhD, we first identified and characterized H4K20 methylase of the Set8 family in *Toxoplasma gondii*. H4K20 methylation is considered to have an evolutionary ancient role in DNA repair/genome integrity, while its function in heterochromatin function/gene expression is thought to have arisen later during evolution. Remarkably, parasite TgSet8-related proteins display H4K20 mono-, di-, and trimethylase activities, whereas HSET8 is monomethylase-restricted. Structurally, few residues forming the substrate-specific channel dictate the enzyme methylation multiplicity. These enzyme and its mark H4K20-me1 are cell cycle regulated and focally enriched at pericentric and telomeric heterochromatin in *T. gondii* et *P. falciparum*. Taken together, our findings show that the heterochromatic function of SET8 and H4K20 is not restricted to metazoans. Secondly, we have investigated the role of KMTox, another histone lysine-methyltransferase, in *Toxoplasma gondii*. KMTox is a nuclear protein that holds a High Mobility Group domain, which is thought to recognize bent DNA. The enzyme methylates both histones H4 and H2A *in vitro* with a great preference for the substrate in reduced conditions. Importantly, KMTox interacts specifically with the typical 2-cys peroxiredoxin-1 and the binding is to some extent enhanced upon oxidation. It appears that the cellular functions that are primarily regulated by the KMTox are antioxidant response and maintenance of cellular homeostasis. KMTox may regulate gene expression in *T. gondii* by providing the rapid re-arrangement of chromatin domains and by interacting with the redox-sensor TgPrx1 contribute to establish the antioxidant response in *T. gondii*.