



HAL
open science

Influence de *Toxoplasma Gondii* dans la régulation d'UHRF1 via la voie NF-KB

Ghaidaa Kanjo

► **To cite this version:**

Ghaidaa Kanjo. Influence de *Toxoplasma Gondii* dans la régulation d'UHRF1 via la voie NF-KB. Parasitologie. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ068 . tel-01251696

HAL Id: tel-01251696

<https://theses.hal.science/tel-01251696v1>

Submitted on 6 Jan 2016

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

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

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé
Dynamique des interactions hôtes pathogène- EA 7292

THÈSE présentée par :
Ghaidaa KANJO

Soutenue le : 30 Septembre 2014

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline: Sciences du vivant / spécialité : Parasitologie

**INFLUENCE DE *TOXOPLASMA GONDII*
DANS LA REGULATION D'UHRF1 VIA
LA VOIE NF- κ B**

THÈSE DIRIGÉE PAR :

Pr. CANDOLFI Ermanno

Directeur de thèse, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr. VILLENA Isabelle

Dr. AJZENBERG Daniel

Rapporteur Externe, Université de Reims

Rapporteur Externe, Université de Limoges

Examineur Interne :

Pr. STOLL-KELLER Françoise

Examineur Interne, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

A l'issue de la rédaction de ce travail, je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont aidé pour réaliser ce travail de thèse et m'ont permis de progresser et de finir cette recherche.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse Pr. Ermanno CANDOLFI, pour m'avoir fait confiance malgré les connaissances plutôt légères que j'avais en arrivant dans son équipe de recherche, puis pour m'avoir guidé, encouragé, conseillé, fait beaucoup d'effort pendant la durée de ma thèse pour terminer ce travail. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de cette thèse.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au Dr. Julie BRUNET pour m'avoir encadré pendant la durée de ma thèse. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris.

J'exprime tous mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury de thèse:

Pr. Villena Isabelle, qui m'a fait l'honneur d'examiner cette thèse, et je lui en remercie, de même que pour sa participation au Jury.

Pr. Stoll-Keller Françoise, qui a accepté de juger cette thèse, et je lui en remercie, de même que pour sa participation au Jury.

Dr. Ajzenberg Daniel, qui a accepté de juger cette thèse, et je lui en remercie, de même que pour sa participation au Jury.

J'adresse toute ma gratitude à tous mes ami(e)s et à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail. Je pense particulièrement à Alexander, Estérina, Lydia, Caroline, Cécile, Elise, Sylvie, Rolland et Bruno pour leurs conseils et leur collaboration ainsi que leur disponibilité à l'égard de mes travaux. Je tiens à remercier également Elisabeth, Marie qui m'ont accompagné durant les deux premières années de ma thèse pour leur gentillesse et bon humeur.

J'adresse toute ma gratitude à tous mes ami(e)s ; Homam, Ramez, Rouba, Zou Alfakar, Ali, Abir, Yasser et Walaa pour leur soutien et leur écoute.

Enfin, qu'il me soit permis de dédier ce mémoire aux membres de ma famille et à mes amis qui m'ont soutenue dans la réalisation de cette thèse. Je tiens à remercier tout particulièrement mes parents, mes frère (Imad, Modar et Houssam), mes sœurs (Ilham et Lana), mes nièces (Wafaa, Souzan, Diana et Mais), mes neveux (Karam, Hassan et Ghaith) pour leur soutien et leur écoute.

À mon pays la Syrie, malgré la guerre, la mort et la souffrance, tu resteras la plus belle rose dans le monde.

SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| SOMMAIRE | 5 |
| ABREVIATIONS | 9 |
| LISTE DES FIGURES | 11 |
| INTRODUCTION | 12 |
| I CHAPITRE I : <i>TOXOPLASMA GONDII</i> ET LA TOXOPLASMOSE | 13 |
| 1 <i>Toxoplasma gondii</i> | 13 |
| 1.1 Les différents stades parasitaires | 14 |
| 1.1.1 Tachyzoïtes | 15 |
| 1.1.2 Bradyzoïtes | 15 |
| 1.1.3 Sporozoïte | 17 |
| 1.2 Organisation moléculaire | 17 |
| 1.2.1 Les micronèmes | 18 |
| 1.2.2 Les rhoptries | 18 |
| 1.2.3 Les granules denses | 18 |
| 1.3 Génotypes et virulence | 20 |
| 1.3.1 Génotype I | 21 |
| 1.3.2 Génotype II | 21 |
| 1.3.3 Génotype III | 22 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1.3.4 | Génotypes recombinants ou avec allèles atypiques | 22 |
| 1.3.5 | Facteurs parasitaires liés à la virulence | 25 |
| 1.4 | Cycle biologique de <i>T. gondii</i> | 26 |
| 1.4.1 | Cycle asexué | 26 |
| 1.4.2 | Cycle sexué | 26 |
| 1.5. | Contamination | 27 |
| 2 | La toxoplasmose | 28 |
| 2.1 | Epidémiologie | 28 |
| 2.2 | La toxoplasmose humaine | 31 |
| 2.3 | Traitements | 32 |
| II | Chapitre II: <i>T. gondii</i> et le facteur de transcription NF-κB | 33 |
| 1 | Le facteur de transcription NF-κB | 33 |
| 2 | Structure de la famille NF-κB/Rel | 37 |
| 3 | La famille des protéines IκB | 40 |
| 4 | Interaction NFκB/ IκB | 41 |
| 5 | Le complexe IKK (IκB kinase) | 43 |
| 6 | Régulation de l'expression des gènes par NF-κB | 45 |

| | | |
|------------|---|----|
| 7 | La voie de signalisation de NF-κB | 47 |
| 8 | Rôle de NF-κB dans l'inflammation | 51 |
| 9 | La voie NF-κB et l'infection par <i>T.gondii</i> | 53 |
| 10 | La régulation différentielle de NF-κB en fonction de la virulence des souches de <i>T.gondii</i> | 58 |
| 11 | Interactions de différents facteurs parasitaires avec la voie de signalisation de NF-κB | 63 |
| III | Chapitre III : <i>Toxoplasma gondii</i> et le facteur de transcription UHRF1 | 67 |
| 1 | Le facteur de transcription UHRF1 | 67 |
| 2 | Fonctions d'UHRF1 | 68 |
| 2.1 | Régulation du cycle cellulaire | 68 |
| 2.2. | Epigénétique | 71 |
| 2.3 | Cancers | 72 |
| 2.4 | L'infection par <i>Toxoplasma gondii</i> | 74 |
| | OBJECTIFS ET MOYENS | 76 |
| | Article: | 80 |
| | Synthèse en français de l'article à soumettre | 80 |

| | |
|-----------------------------------|-----|
| Article | 85 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 115 |
| BIBLIOGRAPHIE | 129 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|--|---|
| ADN: Acide DésoxyriboNucléique | IL-8: Interleukine 8 |
| AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments | IMC: Inner Membrane Complex |
| CCR5 : Le récepteur à C-C chimiokine de type 5 | IRF-1: Interferon regulatory factor 1 |
| Cdk: Cycline dependante kinases | IRGs: IFN γ -inducible Immunity-Related GTPases |
| ChIP: Chromatine Immunoprecipitation | IκB: Inhibitor of NF- κ B |
| c-IAP: Cellular Inhibitors of Apoptosis | kDa: kilodalton |
| CKI: Cdk Inhibitor | KO: Knock out |
| CYLD: Cyldromatosis (turban tumor syndrome) | LPS: Lipopoly-saccharides |
| DL: Dose Létale | LTb: Lymphotoxin b Receptor |
| DNMT1: DNA méthyltransférase 1 | Luc : Luciferase |
| EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique | MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein ou CCL2 |
| H3K9MT: histone H3 lysine 9 methyltransferase | MGG: May-Grunwald-Giemsa |
| HAT: Histone Acetyl Transférase | MVP: Membrane de la Vacuole Parasitophore |
| HDAC: Histones Desacétylases | MyD88: Myeloid differentiation primary response gene (88) |
| HDAC1: histone désacétylase 1 | NEMO: NF- κ B Essential Modulator |
| HIF1: Hypoxia Inductible Factor 1 | NFAIP3: l'A20 désubiquitination enzyme |
| IAPs: Inhibitor of apoptosis | NF-κB: Nuclear factor- κ B |
| ICAM-1: intracellular cell adhesion molecule 1 | NIK: NF- κ B-inducing kinase |
| IFN-γ: interferon gamma | NK: Natural Killer |
| IKK: I κ B Kinase | NLS: Signal de localisation nucléaire |
| IL-1: Interleukine1 | NO : Monoxyde d'azote |
| IL-12: Interleukine12 | PAMP: motifs moléculaires issus de micro-organismes pathogènes |
| IL-6: Interleukine6 | PBS: Phosphate Buffered Saline |

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

PH: potentiel hydrogène

PHD: Plant Homeo Domain

PRB: Proteine of Retinoblastoma

PRR: récepteurs de reconnaissance de la surface cellulaire

RFLP: Restriction Fragments Length Polymorphism

RHD: Rel homology domain

RING: Really Interesting New Gene

SNP: single-nucléotide polymorphisme).

SRA: Set and Ring Associated

STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription

TAD: Le domaine de transactivation de la transcription

Th1: T helper de type 1

TLR: Toll-like receptor

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha

TRAF1 et 2: TNF-receptor-associated factors 1 and 2

TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing
interferon- β

TTD : un domaine Tadem Tudor

TVN: réseaux tubulo-vésiculaire

UHRF1: Ubiquitin-like containing PHD and Ring
Finger domains, 1

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VIR : Virulent loci

VP : Vacuole Parasitophore

VP : Vacuole Parasitophore

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Figure 1 : | <i>Ctenodactylus gundi</i> | 13 |
| Figure 2 : | Position taxonomique de <i>T. gondii</i> | 14 |
| Figure 3 : | Structure d'un tachyzoïte de <i>T. gondii</i> | 16 |
| Figure 4 : | Kyste tissulaire renfermant des bradyzoïtes de <i>T. gondii</i> | 16 |
| Figure 5 : | Oocystes de <i>T. gondii</i> | 17 |
| Figure 6 : | Présentation schématique des clades de <i>T.gondii</i> | 24 |
| Figure 7 : | Cycle parasitaire de <i>T. gondii</i> | 28 |
| Figure 8 : | Prévalence de la toxoplasmose en France | 30 |
| Figure 9 : | Membre de la famille NF- κ B | 38 |
| Figure 10 : | Membre du Classe I de la famille NF- κ B | 39 |
| Figure 11 : | Membre de la famille I κ B | 41 |
| Figure 12 : | Un modèle de la dégradation des voies de régulation I κ B α dans les cellules basales et stimulées | 42 |
| Figure 13 : | Voie de signalisation de NF κ B et l'activation du complexe IKK | 45 |
| Figure 14 : | Stimuli et gènes cibles de NF- κ B | 46 |
| Figure 15 : | Voie classique et voie alternative de NF- κ B | 48 |
| Figure 16 : | Modèle représentant la modulation de l'expression de NF- κ B dans les cellules infectées | 57 |
| Figure 17 : | Rôle fonctionnel des domaines d' UHRF1 | 67 |
| Figure 18 : | Régulation du cycle cellulaire | 70 |
| Figure 19 | Présentation schématique de la phase précoce et tardive dans les cellules infectées avec RH et Pru | 126 |
| Figure 20 | Présentation schématique de la phase précoce et tardive dans les cellules infectées avec LEF | 128 |

INTRODUCTION

CHAPITRE I : *TOXOPLASMA GONDII* ET LA TOXOPLASMOSE

1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire obligatoire qui appartient au phylum des Apicomplexa. Ce phylum regroupe de nombreux agents pathogènes d'incidence majeure sur le plan médical et vétérinaire comme les *Plasmodium* responsable du paludisme, les *Eimeria* responsables de coccidioses aviaires. *T. gondii* a été isolé pour la première fois en 1908 par Nicolle et Manceaux chez un rongeur Africain, le gondi (*Ctenodactylus gundi*).



Figure 1 : *Ctenodactylus gundi* (Rothmann, 1776)

T. gondii est capable d'infecter un très grand nombre d'animaux à sang chaud y compris l'homme (Sibley *et al.*, 2003, Sundar *et al.*, 2001).

| | |
|----------------------|-----------------|
| Embranchement | Protozoa |
| Phylum | Apicomplexa |
| Classe | Sporozoa |
| Sous-classe | Coccidia |
| Ordre | Eucoccidae |
| Sous-ordre | Eimeriorina |
| Famille | Sarcocystidae |
| Sous-famille | Toxoplasmatidae |
| Genre | Toxoplasma |
| Espèce | gondii |

Figure 2 : Position taxonomique de T. gondii

1.1 Les différents stades parasitaires

Toxoplasma gondii existe sous trois stades évolutifs différents :

1.1.1. Tachyzoïtes

Forme intracellulaire végétative, il se présente sous forme d'un croissant de 6 à 8 µm de long sur 3 à 4 µm de large. Il infecte toutes les cellules nucléées de l'hôte et s'y multiplie au sein d'une vacuole parasitophore.

La partie antérieure présente un complexe apical qui comporte le conoïde et des organelles sécrétoires (micronèmes, rhoptries et granules denses).

1.1.2. Bradyzoïtes

Les bradyzoïtes résultent de la transformation du stade tachyzoïte sous l'influence de facteurs immuns (IFN-gamma, NO) ou métaboliques (pH). Ils sont caractéristiques de la phase chronique de l'infection. Morphologiquement très proche des tachyzoïtes, ils s'en distinguent par un métabolisme et une réplique ralentis. Les bradyzoïtes sont regroupés au sein de kystes où ils sont inaccessibles aux défenses immunitaires et aux traitements actuels. Ils siègent dans des organes cibles : muscles et le système nerveux y compris l'œil. Les cellules infectées sont principalement les neurones, les astrocytes et les cellules musculaires.

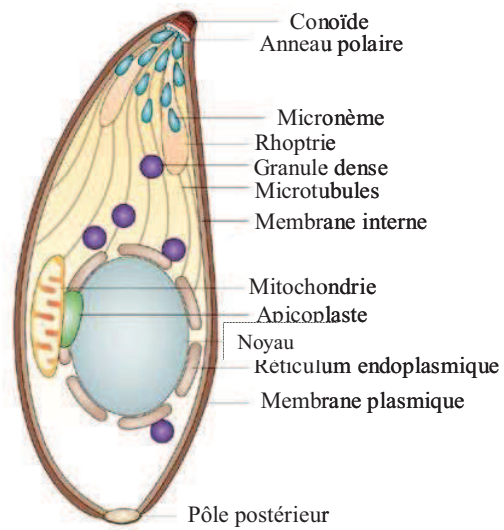


Figure 3 : Structure d'un tachyzoïte de *T. gondii* (d'après Baum et al., 2006)

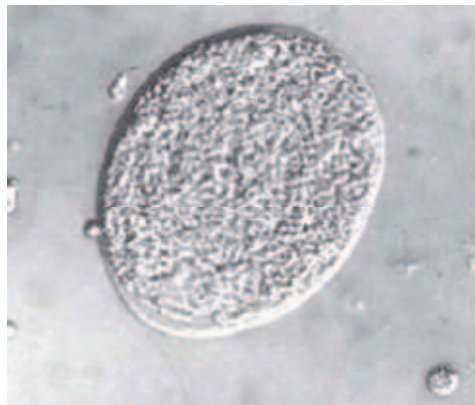


Figure 4 : Kyste tissulaire renfermant des bradyzoïtes de *T. gondii* (Dr L.M. Weiss, Albert Einstein

College of Medicine.)

1.1.3. Sporozoïte

Le sporozoïte est le résultat de la reproduction sexuée qui a lieu dans les cellules de l'épithélium intestinal de l'hôte définitif. Morphologiquement peu différent des autres stades infectieux, il est contenu dans des oocystes sporulés qui peuvent survivre sur le sol plus d'un an dans un climat humide. C'est le stade de dissémination tellurique.



Figure 5 : oocystes de *T. gondii* (http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/image_library.htm)

1.2 Organisation moléculaire

Toxoplasma gondii est un parasite eucaryote unicellulaire haploïde, qui présente certaines caractéristiques conservées chez tous les eucaryotes, mais également des organites spécifiques de son groupe, les Alveolata, ou de son phylum, les Apicomplexa.

Outre les organites communs aux autres cellules eucaryotes (noyau, mitochondrie, réticulum endoplasmique...), *T. gondii* possède des organites impliqués dans le processus d'invasion cellulaire communs aux Apicomplexae : les micronèmes, les rhoptries et les granules denses.

1.2.1 Les micronèmes

Ce sont les organites apicaux les plus petits, en forme de bâtonnets mesurant 0,4 x 0,1 μm . Ils apparaissent souvent légèrement arqués, probablement du fait d'une association avec la face cytoplasmique de l'IMC (Inner Membrane Complex). Il existe 12 micronèmes appelées MIC (MIC 1 à 12), qui sont soit solubles soit transmembranaires. Elles sont libérées lors du contact initial du parasite avec la cellule-hôte et participent à l'attachement du parasite à la membrane de la cellule-hôte (Sheiner *et al.*, 2010).

1.2.2 Les rhoptries

Les rhoptries, en forme de croissant allongé, mesurent de 1 à 4 μm de long. On trouve 6 à 12 rhoptries au pôle apical de chaque parasite. Elles sont délimitées par une membrane. Les rhoptries contiennent un grand nombre des molécules clés qui permettent au parasite de pénétrer dans les cellules hôtes et de subvertir les voies de signalisation de la cellule hôte en faveur du parasite (Boothroyd et Dubremetz., 2008, Saeij *et al.*, 2006, Taylor *et al.*, 2007). Les rhoptries contiennent de nombreuses protéines (dont les protéines ROP) ainsi que des lipides. L'analyse protéomique d'une fraction purifiée de rhoptries a permis de découvrir 38 nouvelles protéines de rhoptries putatives, dont certaines sont bien localisées dans les rhoptries (Bradley *et al.*, 2005). Les ROP sont relarguées durant l'invasion et migrent vers 3 localisations principales : la lumière de la vacuole parasitophore naissante, la membrane de la vacuole parasitophore ou l'intérieur de la cellule-hôte (noyau). Elles sont notamment impliquées dans la régulation des voies de signalisation de la cellule-hôte.

1.2.3 Les granules denses

Les granules denses sont des structures sphériques de 200 nm de diamètre, qui apparaissent denses aux électrons en microscopie électronique. On en compte environ 15 par tachyzoïte, dispersés dans l'ensemble du cytoplasme. Le contenu des granules denses se déverse dans la vacuole parasitophore lors de l'invasion de la cellule hôte (Alexander *et al.*, 2005, Lim *et al.*, 2012). Ils jouent un rôle majeur dans les modifications structurales de la vacuole parasitophore. Elles s'associent à la vacuole parasitophore et au réseau tubulaire de la cellule-hôte, intervenant de ce fait dans le recrutement des nutriments et dans l'inhibition des voies apoptotiques de la cellule-hôte (Mercier *et al.*, 2005).

1.3 Géotypes et virulence

Bien que correspondant à une seule espèce et malgré 98% d'identité génétique, les souches de *T. gondii* diffèrent grandement en matière de virulence (Sibley et Boothroyd, 1992). La pathogénicité des souches est définie par l'étude de leur virulence chez la souris (détermination de la DL 50 et DL 100, doses minimales de parasites entraînant la mort de 50% à 100% des souris infectées).

La classification ancienne opposait, d'une part les souches d'Europe et d'Amérique du Nord, d'émergence récente et appartenant à trois lignées clonales majoritaires I, II et III ayant des degrés de virulence variés (Su *et al.*, 2002, Saeij *et al.*, 2005) ; d'autre part les souches atypiques isolées en Amérique du Sud, beaucoup plus ancestrales, ayant un haut degré de polymorphisme et une virulence élevée (Su *et al.*, 2002). Ces souches sont caractérisées par la présence d'allèles uniques non retrouvés dans les trois types principaux.

Les différences entre les principaux géotypes d'isolats concernent :

1. la virulence pour la souris (une souche est considérée comme virulente pour la souris lorsque la dose létale DL 100 est de 1 tachyzoïte inoculé par voie intrapéritonéale, entraînant la mort de la souris en moins de 10 jours).
2. la vitesse de multiplication en culture cellulaire et la possibilité de transformation *in vitro* des tachyzoïtes en bradyzoïtes aboutissant à la formation de kystes.

3. les capacités de migration et de transmigration à travers les barrières biologiques.

1.3.1 Génotype I

Il est très rarement isolé (ne représente que 10% des souches en Europe et aux Etats-Unis, il est principalement isolé chez l'homme). C'est un génotype très virulent pour la souris. Par exemple, la souche RH a une DL100 de 1 tachyzoïte chez la souris. Les tachyzoïtes se multiplient rapidement *in vitro*, ils se transforment peu en bradyzoïtes et en conséquence, peu de kystes sont formés (ces souches peu kystogènes sont peu infectantes pour le chat). Leur capacité de migration et de transmigration à travers les barrières biologiques *ex vivo* est supérieure à celle des types II et III. Lors de toxoplasmoses humaines causées par ces souches, les atteintes congénitales sont souvent sévères.

1.3.2 Génotype II

C'est le génotype le plus fréquent isolé chez l'homme (80% des souches humaines en Europe et aux Etats-Unis), le mouton, le porc... Il est non virulent pour la souris (DL $100 \geq 10^3$ tachyzoïtes), mais ces souches sont kystogènes donc infectantes pour le chat et génératrices d'oocystes. Chez la souris, la sécrétion d'IFN- γ est contrôlée et protectrice, il y a par ailleurs induction précoce de la sécrétion d'IL-12 par les macrophages. Des études ont montré que les souches de type II étaient plus

fréquemment retrouvées chez les patients VIH et lors d'infections congénitales. Lors de toxoplasmose humaine : les atteintes congénitales peuvent être asymptomatiques à mortelles, des réactivations sont possibles au cours des états immunodéficients (ce sont les souches prédominantes chez les sidéens), chez le patient immunocompétent, on observe des formes lymphadénopathiques et des formes asymptomatiques.

Il est responsable de 88.6% des cas de toxoplasmoses congénitales avec les mêmes caractéristiques que d'habitude, de 90,9% des cas de toxoplasmoses oculaires (immunodéprimés ou immunocompétents), de 84% des toxoplasmoses systémiques des patients immunodéprimés. (Rapport CNR, 2014).

1.3.3 Génotype III

Il est le plus rare (génotype surtout confiné à l'animal). Sa virulence pour la souris est intermédiaire. Concernant la toxoplasmose humaine, les atteintes congénitales sont possibles mais peu fréquentes.

Le type III reste peu fréquent parmi les cas 2013 (3% vs 4,2% sur l'ensemble des 1283 prélèvements génotypés au CNR) et ne présente pas un caractère de pathogénicité plus marqué que le type II. (Rapport CNR, 2014).

1.3.4. Génotypes recombinants ou avec allèles atypiques

Les génotypes atypiques et / ou recombinant se retrouvent plus fréquemment chez les isolats d'espèces exotiques d'accueil, comme par exemple les isolats provenant de la Guyane, des zones géographiquement éloignées, et chez les patients atteints de maladie

grave (Ajzenberg *et al.*, 2004). Ces génotypes ont été associés à la toxoplasmose sévère acquise chez les patients immunocompétents en Guyane française (Carne *et al.*, 2002), la toxoplasmose humaine oculaire (Grigg *et al.*, 2001), et les formes graves de toxoplasmose congénitale (Ajzenberg *et al.*, 2002). Ils sont plus souvent isolés dans des circonstances épidémiologiques particulières (animaux, biotopes sauvages) et sont plus virulents chez la souris que le type II. Lors d'infection chez l'homme, on peut observer des atteintes sévères disséminées ou oculaires chez des sujets immunocompétents (Grigg *et al.*, 2001). Des isolats atypiques de Guyane sont responsables de toxoplasmoses acquises avec des formes multiviscérales, parfois mortelles, chez les personnes immunocompétentes (Demar *et al.*, 2012)

En France, il existe une prédominance très nette des souches de type II (95%) alors que les souches de type I ne représentent que 2% et celles de type III 3% des souches (Rapport CNRS., 2014 ; Honoré *et al.*, 2000). Plusieurs études ont investigué les corrélations possibles entre les types de souches et les manifestations cliniques chez l'Homme (Boothroyd *et al.*, 2002).

La technique de PCR multiplex 15 microsatellites a été validée en 2010 (Ajzenberg *et al.*, 2010). Elle a fait l'objet en 2012 d'une comparaison avec les résultats des techniques de PCR-RFLP (11 marqueurs) et de séquençage (4 introns) utilisées par d'autres équipes (Su *et al.*, PNAS, 2012). Cette comparaison qui a porté sur 138 souches a montré le plus grand pouvoir discriminant des microsatellites, bien adapté aux études épidémiologiques. Elle a aussi permis un regroupement des génotypes dans des haplogroupes plus larges. Au sein du CNR pour la Toxoplasmose, l'analyse génétique des résultats obtenus pour les 15 microsatellites permet de définir les souches comme appartenant soit à une des 3 lignées

clonales initialement décrite (type I, II ou III, avec variant lorsqu'un seul des microsatellites définissant le type est différent), soit à d'autres groupes génétiques caractérisés par leur distribution géographique (African 1, 2, 3 ; Caribbean 1, 2, 3 ; Amazonian...). Des génotypes n'appartenant pas à ces groupes sont qualifiés d'atypiques ou de recombinants. (Rapport CNR., 2014).

Les microsatellites permettent également par leur fort pouvoir discriminant un traçage épidémiologique des cas groupés.

La combinaison de techniques de RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism), microsatellites et séquençage de marqueurs spécifiques ont récemment permis, sur une cohorte de 956 isolats, de définir 138 génotypes, organisés en 15 haplogroupes définissant 6 clades majeures (Figure 7) (Su *et al.*, 2012).

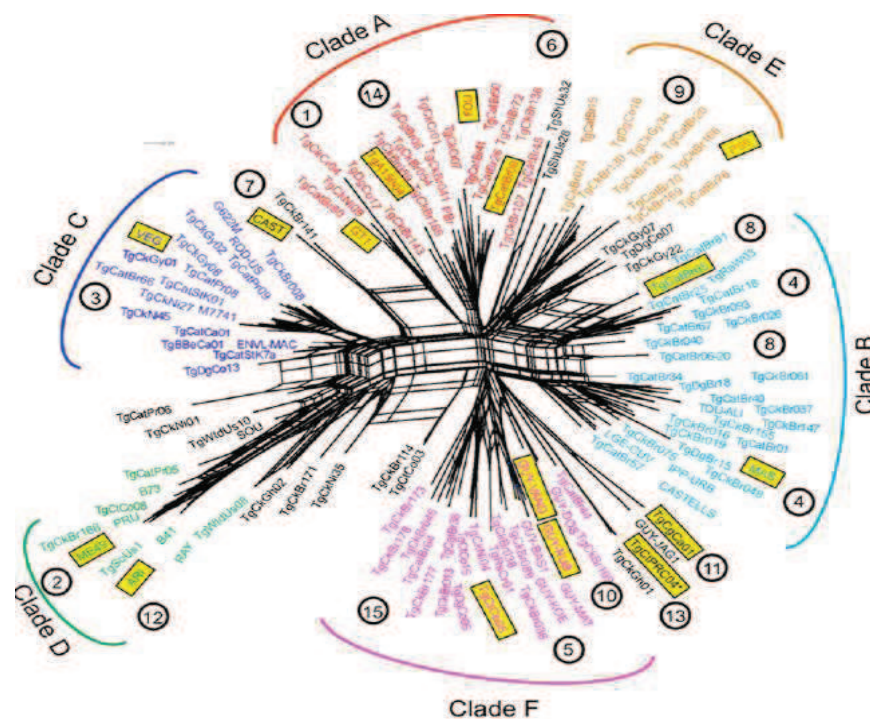


Figure 6 : présentation schématique des clades de *T.gondii*, d'après (Su *et al.*, 2012)

Dans le cadre de ce travail, les souches RH (haplogroupe 1, clade A ; anciennement type I, isolée d'une encéphalite humaine aiguë en 1941), Prugniaud (Pru, haplogroupe 2, clade D, anciennement type II, isolée d'une toxoplasmose congénitale sévère en 1964) et LEF (probablement haplogroupe 8, clade B, anciennement classée parmi les souches atypiques, isolée d'une toxoplasmose congénitale chorioretinogène en 1994) ont été utilisées.

1.3.5. Facteurs parasitaires liés à la virulence

Les gènes responsables de la virulence des souches ont été évalués par expériences de croisement entre des souches I et III ou II et III, introduites ensuite chez la souris. Cinq VIR (Virulent loci) ont été mis en évidence et trois protéines de rhoptries sont incriminées :

- ROP18, une protéine-sérine-thréonine kinase qui phosphoryle et inactive les IRGs (IFN γ -inducible Immunity-Related GTPases) de l'hôte (Fentress *et al.*, 2010, Steinfeldt *et al.*, 2010) ;
- ROP16, une protéine-tyrosine kinase polymorphique qui phosphoryle la famille des protéines STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) de l'hôte (Yamamoto *et al.*, 2009, Ong *et al.*, 2010). Lors de son injection dans la cellule hôte, elle phosphoryle directement STAT3 et STAT6, et dans les cellules infectées par les souches de types I et III, mais pas dans les cellules infectées par des souches de type II, cet effet se maintient (Saeij *et al.*, 2007, Yamamoto *et al.*, 2009, Ong *et al.*, 2010) ;

- un troisième locus, identifié comme ayant le plus grand impact sur la virulence d'une souche de type I chez la souris est représenté par ROP5, qui code pour un cluster de pseudokinases polymorphiques sécrétées (Saeij *et al.*, 2006, Reese *et al.*, 2011).

Plus récemment, un nouveau facteur de virulence, GRA25 a été identifié. GRA25 est une phosphoprotéine sécrétée par les granules denses et retrouvée dans la vacuole parasitophore. GRA25 jouerait un rôle clé dans la régulation de la réponse immunitaire à l'infection par *T. gondii* (Shastri *et al.*, 2014).

1.4 Cycle biologique de *T. gondii*

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

1.4.1 Cycle asexué

Il peut se dérouler chez tous les animaux à sang chaud. Après ingestion des oocystes, leur paroi se rompt dans l'intestin ; ils pénètrent dans les cellules épithéliales intestinales et se transforment en tachyzoïtes qui disséminent rapidement dans l'organisme. Cette dissémination correspond à la phase aiguë de l'infection. Sous l'influence de la réponse immunitaire, la grande majorité des tachyzoïtes est éliminée. Ceux qui ne sont pas lysés migrent et se transforment en bradyzoïtes au sein de certains tissus ; il en résulte la formation de kystes principalement localisés dans tout le système nerveux central, l'œil, et les muscles cardiaques et squelettiques (Dubey, 2008). Les kystes tissulaires peuvent persister toute la vie de l'hôte en l'absence d'altération de l'immunité sans entraîner de manifestations délétères.

1.4.2 Cycle sexué

Il a lieu chez l'hôte définitif (chat) qui se contamine par ingestion de kystes contenus dans leur proie ou par l'intermédiaire d'oocystes souillant l'eau ou les végétaux. Les bradyzoïtes ou les sporozoïtes libérés se multiplient dans les cellules épithéliales du chat par schizogonie. Après plusieurs générations, une phase de gamogonie s'initie. Les formes asexuées se transforment en gamétocytes mâles et femelles. La fécondation conduit à la formation d'oocystes sporulés, éliminés dans le milieu extérieur avec les fèces du chat. Ils deviennent infectieux en 1 à 5 jours. Les oocystes sporulés sont très résistants et restent infectants plusieurs mois dans un sol humide.

1.5 Contamination

La contamination peut se faire :

- horizontalement par ingestion orale des oocystes infectieux de l'environnement : végétaux ou eau de boisson souillés par des selles de félins.
- horizontalement par ingestion orale des kystes contenus dans la viande crue ou insuffisamment cuite.
- verticalement par transmission transplacentaire des tachyzoïtes lors d'une phase de parasitémie maternelle.
- transmission plus exceptionnelle par greffon lors d'une transplantation ou par inoculation accidentelle.

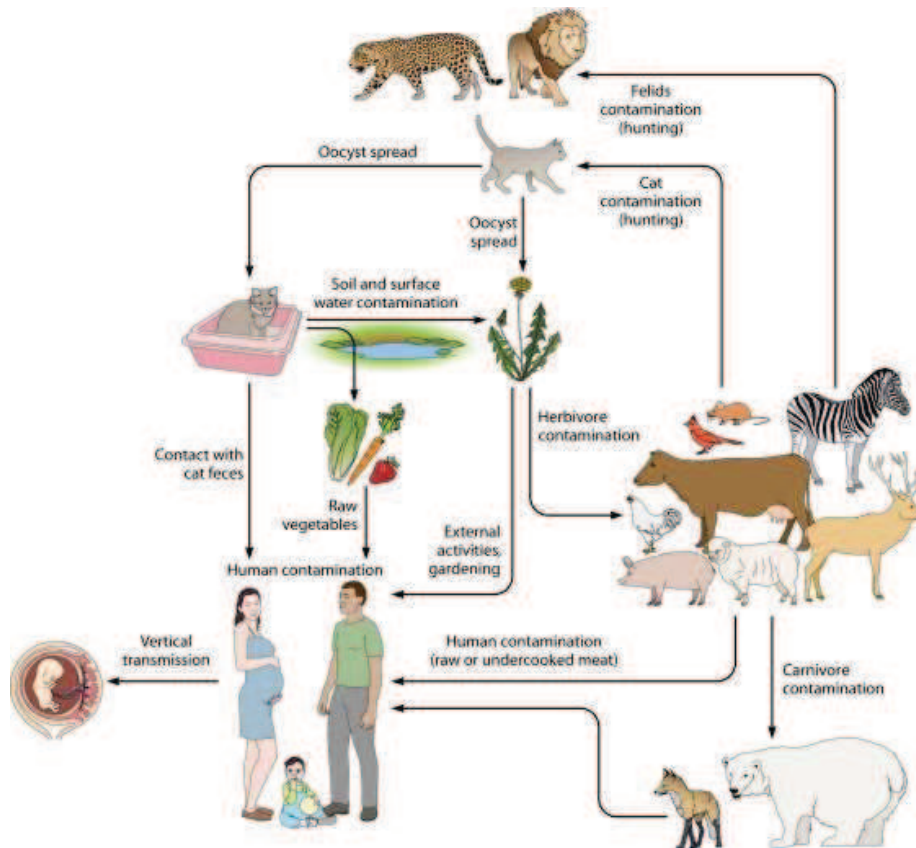


Figure 7 : Cycle parasitaire de *Toxoplasma gondii* (d'après Robert-Gangneux et Dardé, 2012)

2. La toxoplasmose

2.1 Epidémiologie

La toxoplasmose due à *Toxoplasma gondii* est une infection cosmopolite dont la prévalence varie d'un pays à l'autre.

La toxoplasmose est l'une des infections les plus prévalentes en France avec des valeurs de séroprévalence chez l'adulte comprises entre 20 et 55%, variables suivant l'âge, la région géographique et la catégorie socioprofessionnelle. La séroprévalence en France a

varié considérablement depuis 30 ans avec une baisse de prévalence régulière, estimée actuellement à 37% (Résultats ENP, 2010).

Généralement bénigne pour l'homme, cette maladie peut cependant être grave dans certaines circonstances :

1) Chez la femme enceinte, où une primo-infection toxoplasmique peut être transmise au fœtus atteint de toxoplasmose congénitale (TC) pouvant entraîner de graves séquelles. Les formes inapparentes sont les plus fréquentes à l'heure actuelle mais leur pronostic évolutif demeure incertain (risque de chorioretinites ultérieur).

En 2013, 204 cas de toxoplasmoses congénitales ont été diagnostiqués en France ; la prévalence globale de la toxoplasmose congénitale observée en France est autour de 2,6 pour 10 000 naissances et la prévalence des cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués à la naissance est de 1,35 pour 10 000 naissances. La létalité liée à la toxoplasmose congénitale est de 6,4% (stabilité depuis 2007) et la morbidité globale représente 8,5 % (en diminution par rapport à l'année 2011, mais stable par rapport aux années précédentes).

2) Chez les malades immunodéprimés, la toxoplasmose est particulièrement sévère, mortelle sans traitement. Elle correspond le plus souvent à la réactivation d'une infection antérieurement acquise.

La forte prévalence de la toxoplasmose en France dans la population générale expliquait la très forte incidence de la toxoplasmose observée dans les années 1980-90 au cours du SIDA. Depuis les années 2000, avec l'introduction de nouveaux anti-rétroviraux en combinaison, une diminution des cas est observée (avec souvent découverte du statut

VIH en même temps qu'est posé le diagnostic de la toxoplasmose dite opportuniste). Cependant, ce risque demeure pour d'autres types d'immunodépression et tend même à augmenter sans que des données consolidées ne soient encore disponibles (patients atteints de cancer, patients greffés)

3) Chez le patient immunocompétent, des formes graves avec détresse respiratoire aiguë, voire des formes mortelles ont été décrites notamment en Guyane Française. Des formes graves ont aussi été décrites, bien que plus exceptionnellement, sur le territoire métropolitain. Les souches à l'origine de ces cas sévères se sont révélées génétiquement différentes de celles circulant habituellement en France métropolitaine, la surveillance de l'émergence de génotypes atypiques est l'une des missions du Laboratoire Associé Pôle Souches.

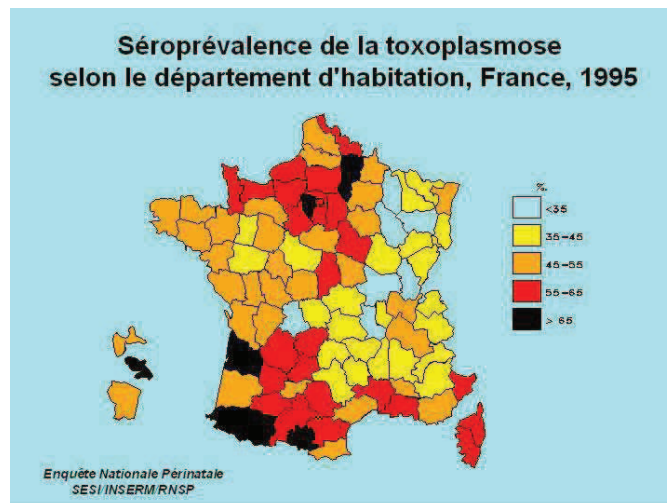


Figure 8 : Prévalence de la toxoplasmose en France (Rapport AFSSA, 2005).

2.2 La toxoplasmose humaine

Habituellement bénigne chez l'être humain, elle est asymptomatique dans 90% des cas d'infection aiguë (Montoya et Liesenfeld, 2004). Cependant dans certaines situations (grossesse, immunodépressions...), l'infection peut s'avérer grave.

La toxoplasmose de l'immunodéprimé (VIH, allogreffe de moelle osseuse, greffe d'organe, chimiothérapie ou traitements immunosuppresseurs) résulte d'une primo-infection ou d'une réactivation de kystes présents chez un sujet antérieurement infecté. Dans le cas de transplantations d'organes, la réactivation peut se faire à partir du greffon si celui-ci est infecté. La principale complication est l'encéphalite toxoplasmique bien que d'autres organes peuvent être touchés comme les poumons ou l'œil.

La toxoplasmose congénitale résulte d'une primo-infection acquise par la mère au cours de la grossesse. Elle a lieu par passage transplacentaire lors de la phase de parasitémie. La probabilité de transmission du toxoplasme et la gravité de l'atteinte fœtale évoluent inversement au cours de la grossesse (Montoya et Liesenfeld, 2004). Il n'y a pas de transmission chez la femme immunisée par une infection antérieure à la grossesse car la réponse immunitaire présente est protectrice et contrôle la dissémination parasitaire. La pathogénie peut aller de l'infection asymptomatique à de graves symptômes (hydrocéphalie, encéphalite) ou à des séquelles (retard psychomoteur, chorioretinites). Le risque d'infection fœtale lui est directement corrélé à l'état d'avancement de la grossesse. Il passe de 10% au premier trimestre à plus de 60% en fin de grossesse.

La toxoplasmose oculaire est une infection redoutable, car potentiellement cécitante. Les lésions sont dues à la présence du parasite dans le tissu rétinien ainsi qu'à la réponse

immunitaire de l'hôte. La chorioretinite toxoplasmique est le plus souvent le résultat d'une réactivation kystique locale dans la rétine, que ces kystes proviennent d'une infection congénitale (cas le plus fréquent) ou non.

Il existe de plus une variabilité clinique au niveau mondiale entre l'Europe et l'Amérique du sud notamment. Le nombre estimé de toxoplasmoses congénitales au Brésil par exemple est 5 à 15 fois plus élevé qu'en Europe ou en Amérique du Nord. La maladie est non seulement plus fréquente en Amérique du sud mais également plus sévère qu'en Europe. En effet, des études montrent que près de 50% des enfants sud-américains vont développer des lésions oculaires au cours de la première année de vie suite à une toxoplasmosse congénitale. De plus, les lésions sont plus grandes, plus nombreuses et le pourcentage de récurrence est également plus élevé (Pfaff AW *et al.*, 2014). En Colombie, le taux de létalité chez les enfants congénitalement infectés en l'absence de traitement prénatal est d'environ 25% (Gomez-Marín *et al.*, 2011).

2.3 Traitements

Il existe un nombre limité de médicaments regroupés en deux grandes familles : les inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique et les macrolides (Derouin, 2001). Ces médicaments ne sont actifs que sur les tachyzoïtes et non sur les kystes. Il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin pour l'homme.

La première prévention chez la femme enceinte reste l'observance d'une série de règles hygiéno-diététiques. Une prise en charge thérapeutique est possible. En France, le

traitement de la mère par spiramycine est utilisé en cas d'infection durant la grossesse. En cas d'infection fœtale prouvée, l'association pyriméthamine-sulfamide sera prescrite.

Pour les patients immunodéprimés, les mêmes recommandations appliquées chez la femme enceinte visant à éviter la contamination seront préconisées. Une chimioprophylaxie par triméthoprime-sulfaméthoxazole pourra être instaurée en cas de forte immunodépression.

Chapitre II: *T. gondii* et le facteur de transcription NF- κ B

1. Le facteur de transcription NF- κ B

Le nuclear factor- κ B (NF- κ B) est un facteur de transcription, élément central de l'immunité innée et adaptative. Il joue un rôle central dans la réponse au stress cellulaire et dans l'inflammation en contrôlant l'expression d'un réseau d'inducteurs et d'effecteurs qui définissent les réponses à des agents pathogènes. Il exerce une forte pression sélective sur les agents infectieux. C'est pourquoi de nombreux parasites, bactéries et virus ont développé des stratégies pour moduler cette voie de signalisation afin de promouvoir leur survie (Tato et Hunter, 2002). Par conséquent, la modulation de l'activation de NF- κ B et sa voie de signalisation offrent une stratégie thérapeutique exceptionnelle qui permettrait de cibler cette voie de signalisation de la cellule hôte (Vitiello *et al.* , 2012).

Les réponses immunitaires aux infections bactériennes ou virales nécessitent l'activation des voies de signalisation spécifiques qui conduisent les signaux extracellulaires de la surface de la cellule hôte vers le noyau (Karin *et al.*, 1995), noyau dans lequel la liaison ou la modulation de l'activité des facteurs de transcription jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes.

NF- κ B est exprimée dans de nombreux types cellulaires et contrôle l'expression de plusieurs gènes pro-inflammatoires et immuno-régulateurs qui déterminent l'issue de la réponse immunitaire innée de l'hôte vis-à-vis des pathogènes microbiens et contribuent à l'activation de presque tous les types de cellules impliquées dans la réponse immunitaire:

les neutrophiles, les macrophages, les lymphocytes, les cellules endothéliales et épithéliales.

Toutes les molécules de NF- κ B sont activées par différents types de stimuli infectieux, mais il persiste encore des questions concernant les rôles spécifiques des membres de la famille NF- κ B au cours d'une réponse immunitaire lors d'une infection. Différents parasites comme *Toxoplasma gondii*, *Leishmania donovani*, *Leishmania major* et *Trichuris muris* sont capables d'activer la cascade de signalisation de NF- κ B. De plus des molécules parasitaires peuvent interférer avec les différentes voies qui mènent à l'activation de NF- κ B. Ainsi, bien que l'activation de la voie NF- κ B représente une partie de la régulation physiologique normale, une activation persistante et excessive du NF- κ B conduit à la production des cytokines pro-inflammatoires, la surproduction des chimiokines et à une inflammation chronique caractéristique des parasitoses latentes.

Plusieurs études récentes suggèrent que l'hyperactivation de la voie de signalisation de NF- κ B est associée à l'élaboration et à la progression de nombreuses maladies, comme les troubles auto-immuns, le cancer, les troubles cardio-vasculaires et les troubles neurodégénératifs.

L'activation des protéines de la famille NF- κ B et leur dimérisation sont les conditions préalables nécessaires à l'induction de la transcription des gènes qui codent pour différentes cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des co-stimulateurs ainsi que des molécules d'adhésion (Caamano et Hunter, 2002, Bonizzi et Karin, 2004). Il y a cinq membres de la famille NF- κ B : RelA (p65), c-Rel, RelB, NF- κ B1 (p50/p105) et NF- κ B2 (p52/p100). Deux d'entre elles, NF- κ B1 et NF- κ B2 sont tout d'abord produites sous la

forme de précurseurs. Le clivage enzymatique de p105 et p100 résulte dans la formation des sous-unités matures p50 et p52, respectivement (Beinke et Ley, 2004). Les protéines c-Rel et RelB sont directement responsables de l'induction des gènes cibles, car ils possèdent un domaine de transactivation. Tandis que les sous-unités p50 et p52 présentent un site de liaison à l'ADN, et une capacité limitée pour activer la transcription des gènes, elles nécessitent donc d'être dimériser avec une protéine du complexe possédant un domaine de transactivation (Hayden et Ghosh, 2004). La capacité de reconnaissance des ADN cibles par les différents membres de la famille varient aussi. Ceci peut être dû à la taille des séquences nucléotidiques reconnues par le facteur de transcription comme par exemple c-Rel qui reconnaît des séquences d'ADN cibles plus larges que RelA ou p50. Cette propriété pourrait permettre à NF- κ B de réguler des sous-ensembles spécifiques des gènes cibles, comme par exemple NF- κ B1 intervenant dans l'ontogénèse des tissus lymphoïdes ou NF- κ B2 intervenant dans la réponse immunitaire et inflammatoire (Gilmore et Gerondakis, 2011). Dans les cellules non stimulées, NF- κ B existe sous la forme d'homo-ou d'hétérodimères liés aux protéines inhibitrices I κ B qui retiennent les molécules du complexe NF- κ B dans le cytoplasme. Différents stimuli extracellulaires tels que les produits microbiens et des cytokines pro-inflammatoires sont capables de déclencher l'ubiquitination et la dégradation d'I κ B par les proteasomes. Ceci libère les membres du complexe NF- κ B, permet la formation des dimères actifs de NF- κ B, leur translocation dans le noyau et l'activation de la transcription des gènes cibles (Pasparakis 2009, Sun et Ley, 2008).

Plusieurs études ont rapporté que *Leishmania* et d'autres parasites tels que *T. gondii* peuvent interférer avec l'activation des voies de signalisation du NF- κ B. Les macrophages infectés par *T. gondii* sont capables d'induire le clivage d'I κ B; toutefois, la dégradation de cette protéine inhibitrice n'a pas conduit à la translocation nucléaire de NF- κ B (Shapira *et al.*, 2002, 2004). Plus récemment, il a été démontré que l'infection des macrophages humains avec *Leishmania major* a conduit à un blocage dans l'induction des sous-unités actives p65/p50, tandis que la translocation nucléaire de complexes c-Rel contenant n'était pas touchée (Guizani-Tabbane *et al.*, 2004). Cependant, malgré les nombreuses recherches sur l'implication des réseaux de régulation NF- κ B dans les infections parasitaire, de nombreux aspects de leur rôle dans la résistance à ces agents pathogènes ne sont pas encore entièrement compris.

2. Structure de la famille NF- κ B/Rel

NF- κ B est le membre le plus largement rencontré dans la famille des facteurs de transcription contenant des dimères de la protéine Rel. Les membres de la famille Rel contiennent un motif de structure similaire, la région d'homologie Rel (RHD, ou RH). Le RHD est impliqué dans la liaison à l'ADN puis sa dimérisation autour de l'ADN, et dans les interactions avec les protéines inhibitrices dans le cytoplasme. Toutes les sous-unités de NF- κ B sont caractérisées par un domaine N-terminal conservé d'environ 300 acides aminés (Perkins *et al.*, 2006). Les protéines Rel sont observées chez de nombreux organismes eucaryotes et le domaine RHD est largement conservé. Toutes les protéines

Rel partage des structures similaires et peuvent être divisés en deux classes basées sur la séquence de C-terminal du domaine RHD (Figure 10).

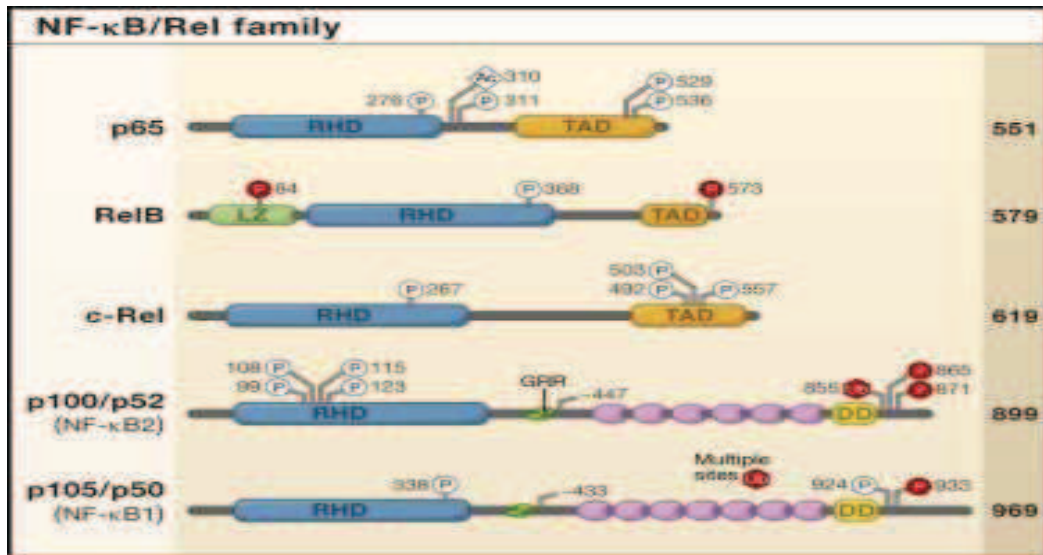


Figure 9: membres de la famille NF-κB, d'après (Hayden et al., 2008)

Les dimères de NF-κB se lient à des sites κB sur les promoteurs / activateurs des gènes cibles et régulent ainsi la transcription *via* le recrutement de co-activateurs ou de co-répresseurs. Le domaine de transactivation de la transcription (TAD) est nécessaire à la régulation positive des gènes. Il est présent seulement chez p65, c-Rel, et RelB, mais pas chez p50 et p52 (Hayden *et al.*, 2008).

Toutes les protéines Rel partagent le Rel Homology Domain (RHD), contenant un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de dimérisation, un signal de localisation

nucléaire et un domaine d'interaction avec la protéine inhibitrice I κ B. Elles peuvent être divisées en deux classes basées sur la séquence de C-terminal du domaine RHD

La première classe (P105, P100 et Drosophila Relish) a des domaines C-terminaux longs qui contiennent des motifs répétés d'un domaine ankyrine, qui contribuent à inhiber ces molécules (*Figure 11*). Lors de son activation, cette chaîne de motifs répétés est clivée par protéolyse en p50 ou p52, les rendant ainsi actives.

Les homodimères p50/p50 et p52/p52 sont transcriptionnellement inactifs et peuvent même être répresseurs en empêchant, par compétition, des dimères transcriptionnellement actifs (p50/p65, p50/c-Rel, p65/p65, p65/c-Rel ou p52/RelB) de se lier à leur site κ B sur l'ADN (Hayden *et al.*, 2004). Ces deux dimères peuvent également occuper constitutivement certains sites κ B tout en respectant ainsi un seuil d'activation de certain gènes cibles de NF- κ B (Hayden *et al.*, 2012)

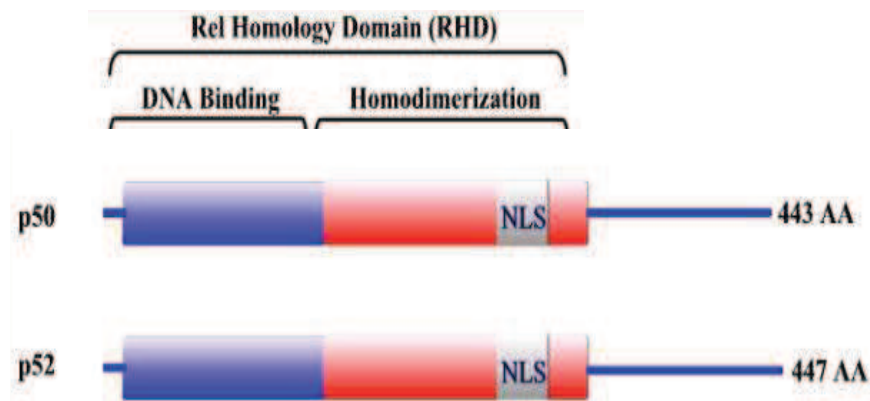


Figure 10 : Membrse du Classe I de la famille NF- κ B (Xiao *et al.*, 2004)

La deuxième classe de protéines NF- κ B est la famille des protéines Rel qui contient une région TAD sur le versant C-terminale de la RHD (Figure 11). Ce domaine est responsable de leur capacité à activer la transcription des gènes cibles, et contient le signal de localisation nucléaire (NLS) qui est responsable de la liaison à l'ADN, de la dimérisation et de l'association avec I κ B.

Cette famille des protéines comprend c-Rel (et son homologue rétroviral v-Rel) les protéines, RelB, RelA (p65), et *Drosophila dorsales* et Dif (Gilmore, 2012).

Les membres de la famille Rel/NF- κ B se lient à des sites de liaison à l'ADN composées de 9 à 10 paires de bases, appelés site κ B: 5'-GGGRNNYYCC-3' où R est une purine, Y une pyrimidine et N n'importe quelle autre base qui peut varier légèrement. Ce qui explique la spécificité de la réponse d'un gène à l'autre selon le site de liaison préférentielle de certains dimères avec certains sites de NF- κ B (Hayden *et al.*, 2004, Karin *et al.*, 2000).

Toutes les protéines Rel peuvent former des homodimères ou des hétérodimères, à l'exception de RelB, qui ne peut pas former des hétérodimères.

3. La famille des protéines I κ B

Comme avec les protéines Rel/NF- κ B, il existe plusieurs protéines I κ B, qui ont des affinités différentes pour chaque complexes Rel/NF- κ B. Elles sont régulées de façon légèrement différente, et sont exprimées dans un tissu de manière spécifique. La famille des protéines I κ B comprend : p105, p100, I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B ζ , Bcl-3 et la protéine

de *Drosophila Cactus* (Figure 12). Elles sont caractérisées par la présence de motifs ankyrine responsables de l'interaction avec le RHD du NF- κ B.

Le membre de la famille le plus étudié est I κ B α . Il est rapidement dégradé durant l'activation de la voie de signalisation NF- κ B conduisant à la libération de multiples dimères de NF- κ B. De plus, l'hétérodimère p65/p50 est une des premières cibles d'I κ B α .

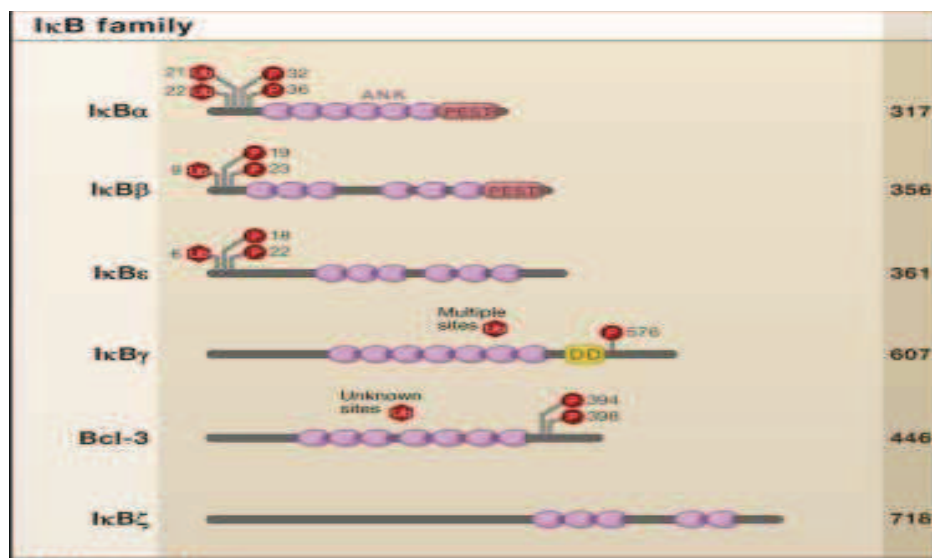


Figure 11 : Membres de la famille I κ B, d'après (Hayden et al. 2008)

4. Interaction NF κ B/ I κ B :

L'activité de NF- κ B est régulée principalement par l'interaction avec les protéines I κ B. L'interaction la mieux étudiée est celle de I κ B α avec le dimère NF- κ B p50/RelA. Cette interaction bloque la capacité de NF- κ B à se lier à l'ADN car le complexe NF- κ B/ I κ B persiste dans le cytoplasme en raison d'un signal d'exportation nucléaire fort du à I κ B α .

Autrement dit, le complexe NF- κ B/I κ B α effectue continuellement la navette entre le noyau et le cytoplasme, mais son taux d'exportation nucléaire dépasse son taux d'importation et donc le complexe reste généralement cytoplasmique. I κ B α entre en contact fréquemment avec NF- κ B et cette interaction cache des séquences de NF- κ B qui sont importantes pour la liaison à l'ADN. De même, lorsque I κ B β interagit avec le complexe NF- κ B, le complexe est retenu dans le cytoplasme. (figure 13)

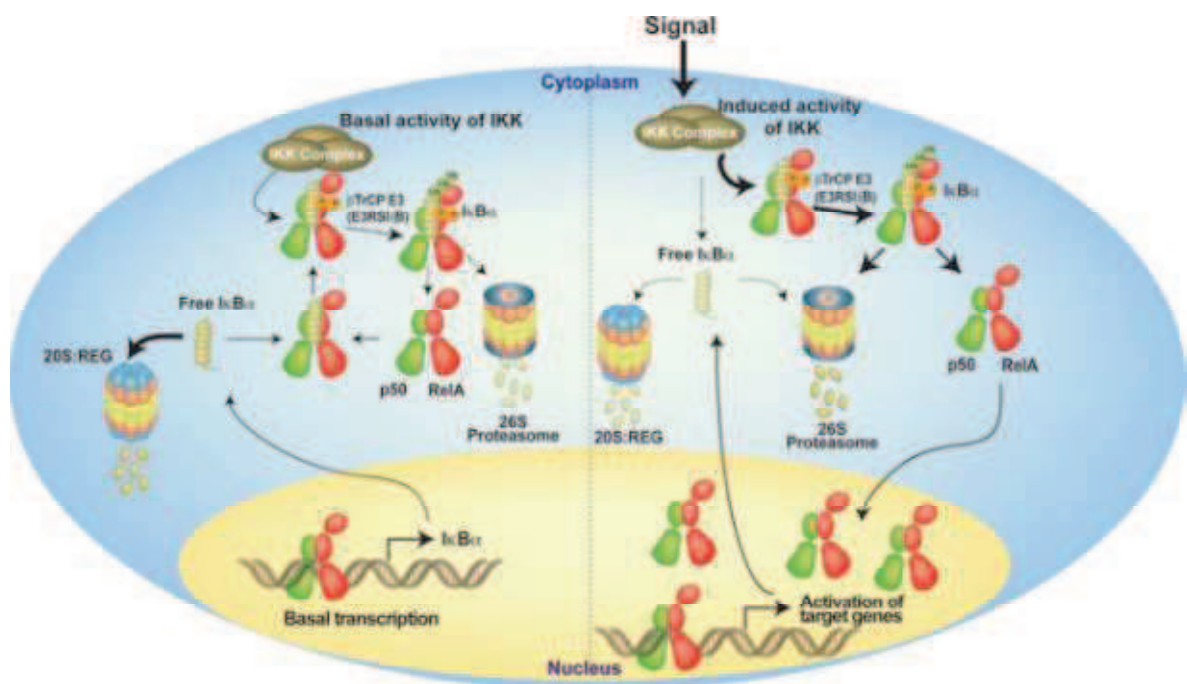


Figure 12 : Un modèle de la dégradation des voies de régulation I κ B α dans les cellules basales et stimulées (Ghosh et al., 2012)

Notre connaissance approfondie de la voie de signalisation Rel/ NF- κ B met en lumière également nos lacunes. Nous avons encore très peu de compréhension de cette voie de signalisation *in vivo* au regard des conditions de fonctionnement d'un mode de fonctionnement physiologique et non pathologique. La culture de cellules en lignée ou

primaire ne reflètent pas fidèlement des événements de signalisations physiologiques. De même, ce qui contrôle l'équilibre entre les différents complexes homo/hétérodimérique *in vivo* reste inconnu. Les études chez *Drosophila melanogaster* ont également montré que de très petites différences dans les concentrations de ces facteurs nucléaires, leurs affinités pour les sites de l'ADN cible, la concurrence entre les protéines Rel et les autres facteurs de transcriptions peuvent avoir de profondes conséquences physiologiques dans les organismes. Enfin, dans de nombreuses situations, on ne connaît pas la nature de l'activation génique ni même l'identité des gènes induits par les dimères issue de la famille Rel/ NF- κ B, et c'est tout particulièrement le cas lors d'une infection parasitaire. Le développement rapide de méthodes de biologie moléculaire contribuant à analyser l'ensemble du génome et son changement d'expression vont permettre de découvrir de nouvelles cibles de Rel/ NF- κ B. La plupart des études fournissent des aperçus plutôt statiques de ces facteurs à l'œuvre. La dynamique de mise en œuvre reste méconnue et ce d'autant plus dans une infection parasitaire tout aussi dynamique. Plusieurs études moléculaires et biochimiques indiquent que les dimères Rel ont des conformations distinctes lorsqu'ils sont liés à l'ADN ou à I κ B. Il y a également peu d'informations sur la manière dont l'un des complexes Rel/ NF- κ B active réellement la transcription lorsqu'il est lié à l'ADN. La nature des co- activateurs ou des facteurs avec lesquels ils interagissent pour activer *in fine* la transcription restent également inconnus. Cette approche

dynamique est en cours de modélisation mathématique en sachant que le temps de contact avec le promoteur du complexe peut n'être que de quelques secondes, à la manière d'un interrupteur ON-OFF.

5. Le complexe IKK (IκB kinase)

La voie de signalisation de NF-κB consiste en une série d'éléments régulateurs positifs et négatifs. L'induction d'un stimulus déclenche l'activation d'IKK, entraînant ainsi la phosphorylation, l'ubiquitination et la dégradation des protéines IκB (Figure 14). La dégradation d'IκB induit rapidement des événements de signalisation qui sont initiés par des phosphorylations spécifiques de ces molécules par IKK activé. Les dimères de NF-κB libérés sont ensuite activés via des modifications post traductionnelles et sont transloqués dans le noyau où ils se lient à des séquences spécifiques et induisent la transcription de gènes cibles.

Le complexe IKK contient deux sous-unités catalytiques nommées IKK α (IKK1) et IKK β (IKK2), et une sous-unité catalytique non réglementaire nommé NEMO (NF-κ B modulateur essentiel) ou IKK γ (Hayden *et al.*, 2006, Scheidereit *et al.*, 2006, Häcker *et al.*, 2006). Malgré leur rôle clé dans la phosphorylation d'IκB α dans le cytoplasme, des travaux récents ont fourni la preuve que les sous-unités IKK sont également transloquées vers le noyau pour réguler l'expression de gènes NF-κB-dépendants et indépendants.

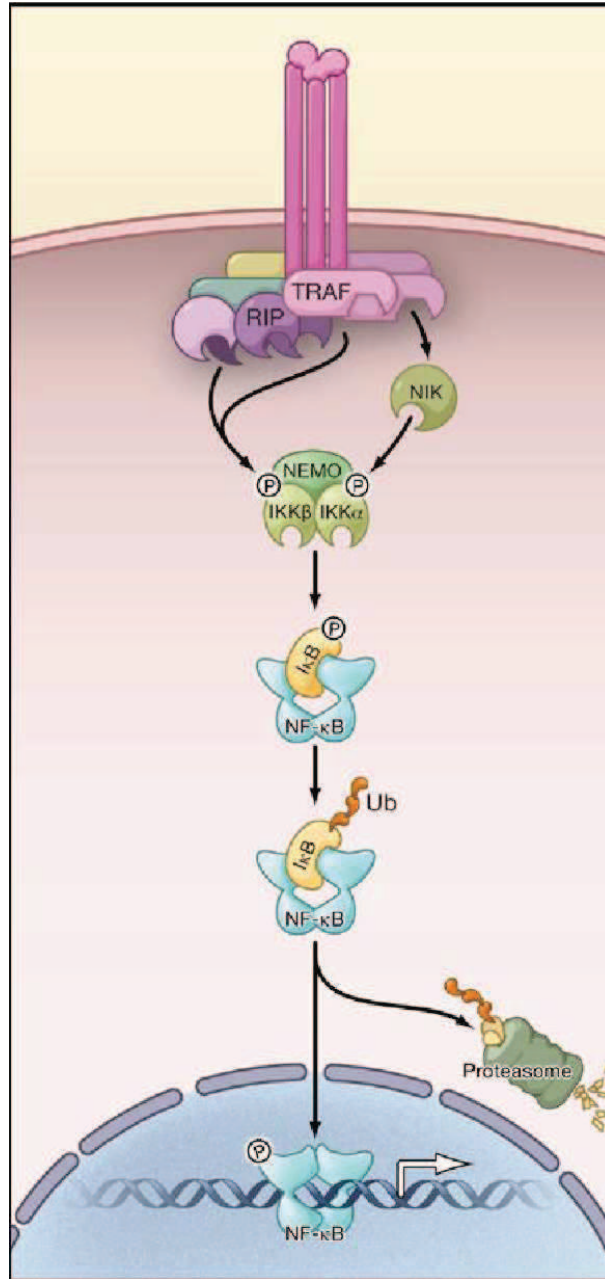


Figure 13: voie de signalisation de NFκB et l'activation du complexe IKK, d'après (Hayden et al. 2008)

6. Régulation de l'expression des gènes par NF- κ B

NF- κ B régule la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la survie cellulaire, l'adhésion cellulaire, l'inflammation, la réponse cellulaire au stress et le remodelage tissulaire (Perkins *et al.*, 2007). NF- κ B contrôle notamment l'expression de gènes contrôlant des cytokines pro-inflammatoires (IL-12, TNF α) (Baeuerle *et al.*, 1994). Il induit également l'expression de gènes pouvant inhiber l'apoptose ; c'est le cas de c-IAP, des membres de la famille Bcl-2 et TRAF1 et 2 (TNF-receptor-associated factors 1 and 2) (Karin *et al.*, 2002) (Figure 15).

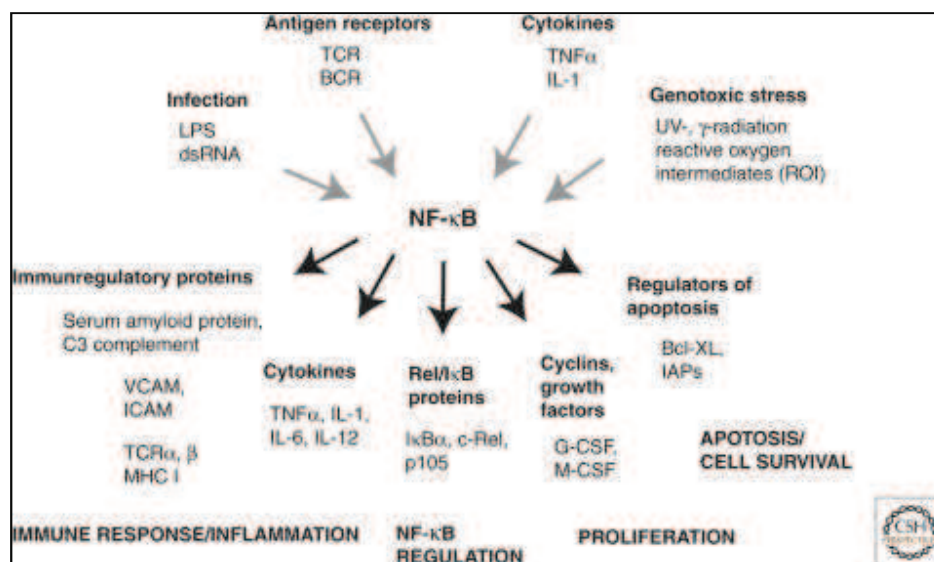


Figure 14 : les stimuli et les gènes cibles de NF- κ B (Oeckinghaus *et al.*, 2009)

Les régulateurs de NF- κ B, tels qu'I κ B α , p105, ou A20 sont eux-mêmes dépendant de NF- κ B, conduisant ainsi à des réactions auto-régulatrices de NF- κ B. D'autres gènes

cibles de NF- κ B sont des éléments centraux de la réponse immunitaire, comme par exemple les molécules du CMH (Oeckinghaus *et al.*, 2009).

7. La voie de signalisation de NF- κ B

Dans la plupart des cellules au repos (non stimulées), les dimères de NF- κ B sont donc maintenus sous une forme inactive dans le cytoplasme par l'association physique de leurs RHDs avec les protéines inhibitrices de NF- κ B, les I κ Bs (I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , BCL3, p100, p105, et I KBL) qui masquent la liaison au domaine d'ADN (Whiteside *et al.*, 1997, Ferreiro *et al.*, 2010).

L'exposition des cellules à une variété de stimuli conduit donc à la phosphorylation rapide et à la dégradation protéolytique d'I κ B, ce qui permet aux dimères issus de la famille NF- κ B de se transloquer vers le noyau activant à priori les gènes de transcription.

Bien que nombreux stimuli dont les cytokines pro-inflammatoires, bactéries, champignons, virus et de leurs produits, les conditions de stress physiologique, les médiateurs apoptotiques et les mitogènes qui ont le potentiel d'activation de la voie de signalisation de NF- κ B, les réponses induites sont à la fois cellulaire et spécifique, ce qui suggère que pas tous les activateurs utilisent les mêmes composants de signalisation et de cascades.

Deux grands voies d'activation du signal de transduction de NF- κ B ont été décrits: la voie classique et la voie alternative (Figure 16) (Matzinger *et al.*, 1998).

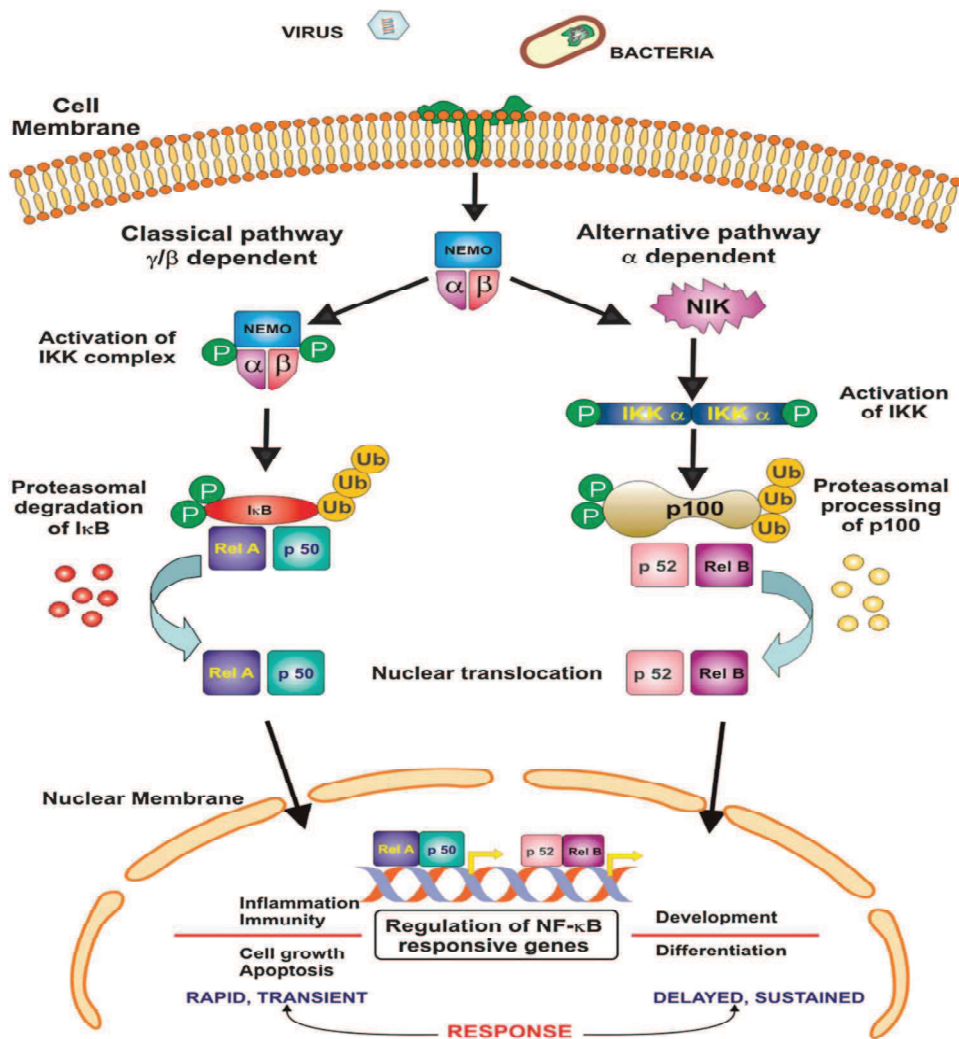


Figure 15: la voie classique et la voie alternative de NF-κB (Vitiello et al., 2012)

La voie classique (ou canonique) dépend du complexe (IκB kinase) IKK composé de deux sous-unités catalytiquement activées de IKKα et IKKβ, et une sous-unité d'échafaudage réglementaire, NEMO, qui est aussi appelé IKKγ. L'activation de NF-κB est donc médiée par la dégradation d'IκBα. Tandis que l'autre voie (ou non canonique)

l'activation dépend au départ d'homodimères IKK α (NIK) (Senftleben *et al.*, 2001 ; Dejardin *et al.*, 2006) (Figure 16).

Les voies de transduction de signal permettent l'activation du complexe IKK lors de la stimulation des récepteurs de reconnaissance de la surface cellulaire ou endogène de motifs hautement conservé (PRR) qui reconnaissent des signaux de danger par conséquent aussi endogènes qu'exogènes (Matzinger *et al.*, 1998). Ces signaux peuvent être des motifs moléculaires issus de micro-organismes pathogènes (PAMP) comme les lipopoly-saccharides (LPS), l'acide lipotéichoïque ou le peptidoglycane en sachant que ces motifs peuvent être également reconnus de façon endogène (Zhang *et al.*, 2009). Cette activation conduit à la phosphorylation et l'ubiquitination d'IkB α au niveau de résidus de sérine du domaine N-terminale et conduit à sa dégradation par le protéasome permettant ainsi la translocation nucléaire des sous-unités associées de NF- κ B (p50-p65) leurs liaisons à l'ADN et à l'activation des gènes et à leur transcription. L'activation de la voie classique se produit habituellement dans les phases précoces et déclenche immédiatement l'induction de plusieurs gènes impliqués dans les réponses immunitaires ou inflammatoires, l'apoptose et la prolifération cellulaire.

La voie alternative, est activée par un nombre plus limité de récepteurs tels que le CD40 ou LTb (*Lymphotoxin b Receptor*). Elle induit la formation des dimères associant RelB à p52 ou p50 (Claudio *et al.* 2002, Saito *et al.* 2003, Senftleben *et al.* 2001). A noter que p100 qui est la forme inactive cytoplasmique de p52 contient aussi un domaine inhibiteur IkB-like en C-terminal, qui peut-être phosphorylé en réponse à un signal par

l'intermédiaire de la kinase NIK (NF- κ B-inducing kinase) ou de IKK α , puis ainsi dégradé elle permetta la translocation des dimères RelB/p50 et RelB/p52 dans le noyau.

La kinase (NIK) est donc une sérine / thréonine kinase qui joue un rôle central dans l'activation des voie de signalisations alternatives (Nemoto *et al.*, 1998). Elle possède d'autres fonctions, L'interaction des stimulations avec les récepteurs de surface cellulaire conduit à l'activation de NIK qui phosphoryle directement IKK α pour déclencher la phosphorylation et le clivage protéolytique de p100 pour produire p52. Cette phosphorylation entraîne l'ubiquitinylation de p100 provoquant sa dégradation partielle, libérant ainsi les complexes NF- κ B contenant la sous-unité RelB qui sont alors transloqués dans le noyau.

La sous-unité p52 peut alors se dimériser avec RelB, p65 ou c-Rel. Toutefois, seul le hétérodimère p52/Rel B est capable de se transloquer vers le noyau. A noter que p52/p65 et p52/c-Rel sont activés à travers la voie classique (Dejardin *et al.*, 2006). Contrairement à l'activation de la voie classique, le processing de p100 et l'activation p52/RelB sont observés plus tardivement, souvent plusieurs heures après l'activation initiale.

En se concentrant sur le LPS, des études récentes ont démontré que ce composant structurel de l'enveloppe extérieure des bactéries Gram négatives induit une activation des deux voies canonique et non-canoniques de NF- κ B dans les cellules épithéliales humaines. Plusieurs rapports ont ainsi suggéré une rétroaction complexe entre ces deux voies et démontrent la capacité de la voie non-canonique à fournir une activation plus soutenue sur des gènes spécifiques comme par exemple BCL10, impliquée dans l'apoptose (Dejardin *et al.*, 2006, Bhattacharyya *et al.*, 2010, Razani *et al.*, 2010). Ainsi

des données récemment publiées montrent que la voie alterne de signalisation de NF- κ B down-régule la production des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules dendritiques, ce qui suggère un rôle important de cette voie alternative de NF- κ B dans la régulation de l'immunité (Tas *et al.*, 2007).

Par conséquent, la régulation croisée entre les voies classiques et alternatives semble être crucial dans la régulation façon optimale de la réponse protectrice caractérisé par l'équilibre entre l'inflammation et l'auto-tolérance (Lawrence *et al.*, 2005).

8. Rôle de NF- κ B dans l'inflammation

Actuellement, la voie de signalisation de NF- κ B est l'un des voies les plus importantes régulant l'expression des gènes pro-inflammatoires dans plusieurs processus pathologiques tels que l'inflammation, le cancer ou les maladies infectieuses (Ben-Neriah *et al.*, 2011, Karin *et al.*, 2005, Lawrence *et al.*, 2005).

En outre, il y a une meilleure compréhension du mécanisme physiopathologique précis de NF- κ B qui mène à l'inflammation. L'inflammation est une réponse induite par des stimuli nocifs et qui contribue à l'apport d'une réponse cellulaire adéquate sur le site inflammatoire. Comme lors d'une infection. Cette réponse inflammatoire a été bien caractérisée pour les infections microbiennes telles que les infections bactériennes et fongiques et qui a permis de mettre en avant le rôle des récepteurs Toll-like (TLR). Suite à une inflammation aiguë, le succès de la réponse se mesure à l'échelle de l'élimination des agents infectieux suivie d'une phase de résolution et de réparation, qui est médiée

principalement par les cellules du tissu cible et par les cellules macrophagiques recrutées sur le site inflammatoire (par exemple les macrophages) (Serhan *et al.*, 2005). Par contre, si la réponse inflammatoire aiguë est incapable d'éliminer l'agent pathogène, le processus inflammatoire persiste et acquiert une nouvelle caractéristique. Les neutrophiles remplacent les macrophages et sont suivis par les lymphocytes T et B de la réponse immunitaire acquise, et si l'effet combiné de ces cellules est encore insuffisant, l'apparition d'un état inflammatoire chronique devient dès lors inévitable. Plusieurs études ont démontré que la réponse inflammatoire représente un sol commun de nombreuses maladies multifactorielles, y compris l'inflammation chronique, les troubles cardiovasculaires, les pathologies neurodégénératives, les maladies auto-immunes, le cancer et divers autres mécanismes de vieillissement (Scriveo *et al.*, 2011). Un des aspects les plus fascinants de l'étude de l'inflammation est la découverte incessante de nouveaux médiateurs. Dans ce contexte, NF- κ B est certes bien caractérisé comme le principal médiateur des réponses inflammatoires lors d'une infection et de l'élaboration des réactions immunitaires. Il est bien établi que l'une des principales fonctions de NF- κ B est son implication clé pour instaurer une réponse immunitaire et inflammatoire efficace contre ces infections, non seulement par l'induction de la transcription des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8), mais aussi la régulation de l'expression des molécules d'adhésion (ICAM-1, V-CAM-1, E-sélectine) (Vitiello *et al.*, 2010). Cela implique un rôle important dans la leucopédèse des leucocytes, par le biais d'une augmentation de leur adhésion à l'endothélium vasculaire proche des lésions inflammatoires. Cette transmigration leucocytaire résulte en une accumulation de cellules immunitaires dans les sites inflammatoires. NF- κ B induit également l'expression

d'enzymes dont les protéines ont une relation étroite avec le processus pathogénique inflammatoire, comme la cyclo-oxygénase inductible ou la Nitric Oxyde synthétase. Toutes ces molécules jouent un rôle essentiel dans les mécanismes biologiques impliquant le recrutement des cellules, l'attachement, la différenciation, la prolifération et l'activation des cellules qui contribuent à une réponse inflammatoire efficace. Toutefois, dans le cadre de perspectives thérapeutiques, une question reste constamment posée : « le blocage d'une seule cytokine pro-inflammatoire suffira-t-il à assurer un traitement anti-inflammatoire adéquat ». À cet égard, la thérapie anti-NF- κ B, qui se concentre sur l'inhibition de l'expression de certains médiateurs de l'inflammation, y compris TNF- α et IL-1, devrait permettre le développement des traitements anti-inflammatoires.

9. La voie NF- κ B et l'infection par *T.gondii*

Nous avons précédemment résumé le rôle de NF- κ B comme étant un facteur de transcription dont l'activité est modulée par une infection. Sans surprise, près de 85% des gènes régulés par NF- κ B sont up-régulés lors de l'infection par *T. gondii*. Ceci inclut les cytokines IL-6, IL-1, IRF-1 (interferon regulatory factor 1) ou l'expression des récepteurs ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecule 1).

Tout d'abord, NF- κ B est reconnu comme contribuant largement à l'élimination du pathogène. Les souris déficientes en certains membres de la famille NF- κ B ont une susceptibilité accrue à *T. gondii*, indiquant de l'importance de cette voie dans la résistance aux pathogènes (Mason *et al.*, 2004). Les souris déficientes en C-Rel sont très sensibles à la phase aiguë de l'infection par *T. gondii*, un traitement avec l'IL-12 est salvateur,

indiquant que le rôle majeur de NF- κ B dans la résistance de *T. gondii* par l'induction de la sécrétion d'IL-12 via C-Rel (Mason *et al.*, 2004). Il existe actuellement à la fois des preuves de l'inhibition et de l'activation de la voie de signalisation de NF- κ B dans les cellules hôtes infectées par *T. gondii*. Moins de 6 h après l'infection, un souche de type I a été montré pour bloquer la translocation nucléaire de la sous-unité p65 et la liaison *in vitro* de la sous-unité de NF- κ B avec l'ADN (Butcher *et al.*, 2001, Shapira *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2004). L'induction de l'IL-12 en réponse à la stimulation par du TNF ou du LPS a également été réduite (Butcher *et al.*, 2001, Kim *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'expression dans les cellules NK d'une forme dominante négative de I κ B α , un inhibiteur global de NF- κ B, contribue à réduire leur capacité à être activée et à produire l'IFN- γ au cours de l'infection par *T. gondii* (Tato *et al.*, 2003).

Cette inhibition de la voie de signalisation de NF- κ B s'avère être tributaire de l'invasion active par des parasites vivants (Butcher et Denkers, 2002). La liaison de p65 au promoteur du TNF a été bloquée (Leng *et al.*, 2009). D'autres groupes, cependant, ont montré que NF- κ B est activé par une souche de type I de *T. gondii*, et que cette activation est nécessaire à l'inhibition de l'apoptose (Molestina *et al.*, 2003, Payne *et al.*, 2003, Molestina et Sinaï., 2005). Une observation constate la phosphorylation et l'ubiquitination de I κ B α par *T. gondii*, mais ses conséquences sur la translocation nucléaire de NF- κ B et la transcription des gènes en aval n'a pas été étudié (Butcher *et al.*, 2001, Molestina *et al.*, 2003, Shapira *et al.*, 2005).

Dans les cellules infectées par *T. gondii*, on remarque une augmentation de I κ B α sous sa forme phosphorylée (Butcher *et al.*, 2001, Molestina *et al.*, 2003). Alors qu'il y a débat

sur la corrélation entre le taux de I κ B α et la localisation nucléaire de NF- κ B pour des temps courts d'infection, il existe un consensus selon lequel après 20 heures d'infection, *T. gondii* entraîne une translocation nucléaire de NF- κ B ainsi que son activation, conduisant à une up-régulation de gènes-cibles ayant une fonction anti-apoptotique ou pro-inflammatoire ou dans la survie cellulaire (Molestina *et al.*, 2003, Sinai *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2001, Payne *et al.*, 2003).

De façon intéressante, l'activation de NF- κ B lors de l'infection est corrélée avec la localisation au niveau de la membrane de la vacuole parasitophore (MVP) d'I κ B α (Molestina *et al.*, 2003). La seule kinase connue pour phosphoryler I κ B α sur les résidus sérine 32 et 36 est IKK. *Theileria parva*, parasite protozoaire, est capable de recruter IKK à sa surface où elle sera activée et ainsi assurer la translocation nucléaire de NF- κ B (Heussler *et al.*, 2002, Dobbelaere et Rottenberg, 2003). Il a donc été suggéré que *T. gondii*, de la même manière, recrutait IKK de la cellule-hôte à la MVP. Le complexe IKK est formé de deux sous-unités catalytiques IKK α et IKK β et d'une sous-unité régulatrice IKK γ (Ghosh et Karin, 2002). Étonnamment, l'accumulation de I κ B α phosphorylé à la MVP dans les cellules infectées n'est pas causé par le recrutement ni de IKK α , ni de IKK β car, contrairement à *Theileria*, IKK α et β n'ont pas été retrouvées au niveau de la MVP de *T. gondii*. De plus, la phosphorylation d'I κ B α retrouvée autour de la MVP se fait en l'absence du complexe IKK actif. En effet, I κ B α phosphorylé est retrouvé autour de la MVP dans des cellules IKK α -/-, IKK β -/- et double knock-out (Molestina *et al.*, 2005). Par contre IKK est requis pour stimuler la phosphorylation maximale du pool d'I κ B α non associé à la MVP. En fait, une activité IKK parasitaire dirigée contre les

sérines 32 et 36 de I κ B α et appelée TgIKK a été mise en évidence (Molestina *et al.*, 2005) et elle se localise effectivement sur la MVP, en lieu en place de l'IKK de la cellule hôte.

En réalité, l'activation de NF- κ B dans les cellules infectées est un phénomène plus complexe qui met en jeu à la fois le complexe IKK de l'hôte dans les stades précoces de l'infection et plus tardivement une TgIKK capable de faire augmenter l'expression de certains gènes (Molestina *et al.*, 2005). En effet, les plus hauts niveaux d'I κ B α phosphorylée retrouvés autour de la MVP sont observés après 18 heures d'infection (75 à 100% de la vacuole est décorée d'I κ B α phosphorylée entre 18h et 24 h d'infection contre 25 à 75 % entre 6 et 9 h d'infection). L'activité de TgIKK est également strictement corrélée à la réplication du parasite (Molestina *et al.*, 2005) et l'absence précoce d'activité de TgIKK durant l'infection suggère que la translocation de NF- κ B à ce stade implique le complexe IKK de l'hôte.

Molestina *et al.*, (2005) ont donc proposé le modèle suivant : la première étape de l'infection déclenche l'activation du complexe IKK de l'hôte ; il en résulte une première vague de translocation de NF- κ B dans le noyau et l'induction de l'expression de gènes régulés par NF- κ B. Plus tardivement, avec la multiplication du toxoplasme, l'activité TgIKK croît et liée à la MVP elle déclenche une deuxième vague d'activation de NF- κ B. La présence d'une boucle d'amplification par un mécanisme autocrine, comme ceux rapportés pour *Theileria*, n'est pas exclue pour maintenir un niveau d'activation de NF- κ B suffisant dans les phases tardives de l'infection (Figure17).

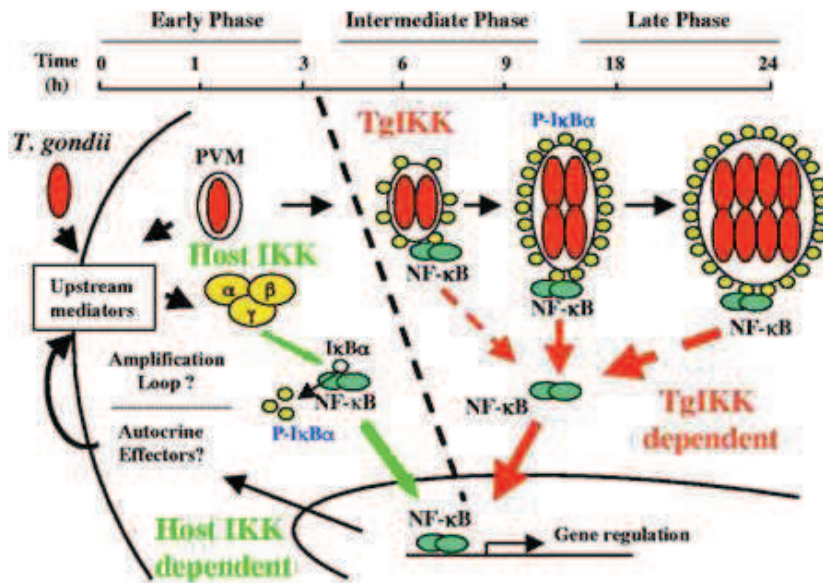


Figure 16: Modèle représentant la modulation de l'expression de NF-κB dans les cellules infectées

(Molestina et al., 2005).

L'activation de NF-κB serait donc un élément crucial pour déclencher un signal de survie dans les cellules-hôtes par exemple en stimulant l'expression de gènes anti-apoptotiques de la cellule-hôte, comme Bcl2 ou IAP. De plus, dans les cellules infectées, une translocation de NF-κB induit une production de cytokines pro-inflammatoires comme IL-8 et MCP1 (Kim et al., 2001). Cette réponse entraînerait un afflux des neutrophiles, monocytes, macrophages et lymphocytes au site d'infection et participerait au contrôle de l'infection. Mais elle pourrait être aussi responsable d'une exacerbation pathologique de la réponse immunitaire, phénomènes immuno-pathologiques, voir même de la dissémination accrue du pathogène à l'intérieur de l'hôte par ces cellules, phénomène de cheval de Troie (Molestina et al., 2003). L'activation de NF-κB par *Toxoplasma* est restée donc controversée, probablement du fait de la reconnaissance de la complexité du génome de *Toxoplasma* et la découverte de très nombreuses souches de parasites. Les

souches de type I peuvent ainsi transitoirement bloquer la translocation de NF- κ B dans le noyau dans des macrophages murins ou des fibroblastes humains. Cependant, l'activation des IKK et la dégradation de I κ B ne seraient pas inhibées (Shapira *et al.*, 2005). Ceci pourrait être expliqué par le fait que dans ces cellules, la translocation de NF- κ B serait sous la dépendance d'autres inhibiteurs d'I κ B comme I κ B β ou I κ B ϵ . Ce blocage de la translocation de NF- κ B entraîne une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire comme l'IL-12 p40, initiateur de la réponse protectrice IFN- γ dépendante, et le TNF- α , ce qui *in fine* serait bénéfique au parasite permettant ainsi une division et une multiplication suffisante des tachyzoïtes. Une fraction d'entre eux survivra à l'attaque du système immunitaire médiée par l'IFN- γ et pourra ainsi former des kystes intracellulaires contribuant à la persistance du parasite dans l'hôte. Ainsi Shapira *et al.*, (2005) ont montré que, dans les fibroblastes humains infectés par la souche RH de type I, IKK de l'hôte était activée tandis que I κ B était dégradée. Cependant, ils n'ont pas observé de translocation de NF- κ B dans le noyau, ni d'activation des gènes régulés par NF- κ B. Ceci ne serait pas la conséquence d'un blocage de l'import nucléaire mais d'une phosphorylation réduite de p65/RelA, événement impliqué dans la capacité de NF- κ B à se transloquer dans le noyau et à se lier à l'ADN.

10. La régulation différentielle de NF- κ B en fonction de la virulence des souches de *T.gondii*

Cependant, la plupart de ces études ont employé une souche virulente de type I de *T. gondii*, or des différences entre les souches ont été observées sur la manipulation de la voie NF- κ B. Très tôt il avait été constaté des différences de modulation en fonction des souches connues au début des années 2000. Les souches de type II provoquaient la translocation nucléaire de NF- κ B dans des splénocytes et des macrophages murins tandis que les souches de type I n'avait montré cette translocation (Dobbin *et al.*, 2002, Robben *et al.*, 2004). Cette différence entre les souches a également été montrée pour avoir des effets en aval. Une infection avec une souche de type II entraînait des niveaux élevés d'IL-12 par rapport à l'infection par une souches de type I (Robben *et al.*, 2004). La grande majorité des souches isolées de *T. gondii* en Europe et en Amérique du Nord appartiennent à trois lignées clonales, les types I, II et III, qui diffèrent par de nombreux phénotypes, y compris leur virulence (Saeij *et al.*, 2005). Chez la souris, les souches de type I sont mortelle, avec une DL100 = 1, alors que les souches de type II ou de type III sont faiblement virulentes avec une DL50 $\approx 10^2$ et 10^5 , respectivement ; (Sibley et Boothroyd., 1992, Saeij *et al.*, 2006). Ces différences entre les souches vis-à-vis de la mortalité murine pourraient avoir pour origine la modulation des voies de signalisation de la réponse immunitaires de l'hôte. Par exemple, la modulation spécifique des souches de la voie de signalisation STAT3 /STAT6 par la kinase parasitaire ROP16 explique en partie les différences de virulence entre les souches (Saeij *et al.*, 2006). Mais il existe aussi des preuves en faveur de la modulation spécifique de la voie de signalisation de NF- κ B responsable de la régulation des réponses immunitaires (Robben *et al.*, 2004). NF- κ B est une partie intégrante de la réponse immunitaire à *T. gondii*. Bien que la preuve existe que *T. gondii* puisse moduler directement la voie de signalisation de NF- κ B (cf

paragraphe précédent), les facteurs parasitaires effecteurs impliqués commencent à être découvert. *T. gondii* peut moduler directement la voie de NF- κ B via certaines protéines parasitaire. Des études récentes ont constaté que les souches de type II de *T. gondii* activent la voie de NF- κ B bien plus qu'une souche de type I ou de type III. Cette différence serait le résultat de la protéine hautement polymorphique GRA15, une protéine de granule dense sécrété par *T. gondii* dans la cellule hôte lors de l'invasion. Avec la protéine de rhoptries ROP16, GRA15 est responsable d'une grande partie des différences dans l'induction de la sécrétion d'IL-12 par les macrophages des souris infectées par *T. gondii* (Rosowski *et al.*, 2011).

Différentes études ont identifié également, sur le chromosome VIIa, un locus associé à la virulence (Saeij *et al.*, 2006, Taylor *et al.*, 2006). Bien que ce locus contienne de nombreux gènes, un en particulier a retenu l'attention : celui codant pour ROP18 qui possède un domaine kinase et de nombreux SNP (single-nucléotide polymorphisme). De plus, l'expression de ROP18 diverge extrêmement entre les souches de type I et III, avec une ROP18-III presque indétectable en comparaison de ROP18-I et II. L'analyse du promoteur de ROP18 a révélé la présence d'une séquence supplémentaire de 2,1 kb, proche du codon d'initiation pour les souches de type III, région qui est absente des souches de type I et II (Saeij *et al.*, 2006).

Des données récentes ont démontré que la partie N-terminale de cette ROP18 est associée au domaine de dimérisation de p65. Cette activité de ROP18 est nécessaire pour la dégradation de p65 et la suppression de l'activité de NF- κ B. Ainsi, par rapport à une souche ROP18 WT, une souche KO pour le site kinase de la ROP18 de type I se montre incapable d'inhiber NF- κ B, aboutissant à la production accrue d'IL-6, d'IL-12, et de

TNF- α dans des macrophages infectés. Nous pouvons donc conclure que ROP18 de type I est responsable de l'inhibition de la voie de signalisation de NF- κ B des cellules hôtes et la suppression de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, permettant ainsi la survie de l'agent infectieux (Du *et al.*, 2014).

La découverte de l'activité de la GRA15 sur la voie NF- κ B a été permise par une série d'expériences. Une infection par des souches de type II induit un haut niveau d'activation de NF- κ B, au contraire des souches virulentes ou pauci-virulentes type I ou III. Des cellules de différentes lignées humaines et murines infectées par des souches de *T. gondii* de types I, II, III montrent que la translocation nucléaire de la sous-unité p65 de NF- κ B s'effectue exclusivement lors d'une infection par une souche de type II. En utilisant la descendance F1 obtenu lors d'un croisement d'une souche de type II \times type III, le gène *GRA15* a été identifié et rendu responsable de l'activation de NF- κ B. Le produit protéique de ce gène est une protéine des granules dense dite GRA15_{II} qui est nécessaire et suffisante pour assurer translocation nucléaire de p65 et pour la transcription médiée par NF- κ B des cellules hôtes. GRA15_{II} active la voie de signalisation NF- κ B de manière indépendante de la voie MyD88 et la voie TRIF, mais dépend de la voie TRAF6. Pour déterminer si la translocation nucléaire de p65 de NF- κ B déclenchée par GRA15_{II} est transcriptionnellement active, Saeij et son équipe ont infecté les cellules HFFS avec une souche de type II GRA15KO, une souche de type I avec un GRA15_{II}, ou de type III, ou une souche de type III avec un GRA15_{II}. L'analyse des transcrits montre que 146 gènes ont été fortement régulé par GRA15 et qu'il s'agit essentiellement de cytokines. Toutefois les souches de type I active aussi la translocation de la p65 de NF- κ B, mais à un niveau beaucoup plus faible que les souches de type II. Les transcrits appartiennent à

des protéines de la voie de signalisation NF- κ B. Il est intéressant de constater que cette translocation survient aussi avec des parasites de type I GRA15 KO indiquant la présence d'autres facteurs parasitaires capables d'activer cette voie de signalisation. Il en va de même lorsque l'on emploie des cellules p65^{-/-} infectés avec des parasites mutants (type II GRA15KO et type I avec GRA15_{II}). Les cellules p65^{-/-} infectées par les souches WT montrent que 32 gènes sont régulés mais seulement trois sont également régulés par GRA15. Ces données indiquent que d'autres sous-unités NF- κ B, tels que c-Rel/p50 dimères, ou d'autres facteurs de transcription pourraient être impliqués dans la régulation de la transcription lors d'une infection par *T. gondii*.

Il est encore difficile de comprendre pourquoi seul GRA15 de type II active de façon importante NF- κ B. Il a été observé un polymorphisme d'acides aminés entre ces différents types de souches y compris une insertion / délétion et plusieurs simples changements d'acides aminés. Le niveau d'expression de GRA15 pourrait être aussi responsable de ce phénotype polymorphe. L'activation s'avère être lente avec des parasites de type I arborant GRA15_{II}. Ces cinétiques lentes ne sont pas sans précédent; ainsi GTPase Rac montre une translocation nucléaire de NF- κ B avec une évolution similaire à celle de GRA15 (Boyer *et al*, 2004). En outre, la quantité de GRA15 augmente lors de la formation de la vacuole parasitophore et ce serait ainsi des niveaux élevés de GRA15 qui seraient responsables de l'activation de NF- κ B.

Le mécanisme moléculaire précis par lequel GRA15 active NF- κ B reste encore à découvrir. GRA15 active de façon préférentiellement l'hétérodimère p65/p50 (Hayden et Ghosh, 2004). Une simple hypothèse, c'est que GRA15 agisse comme un ligand TLR

mais l'activation de p65 par la GRA15 ne dépend pas ni de MyD88 ni de TRIF, deux protéines qui sont essentielles pour les voies de transduction des TLR. GRA15 semble dépendre à la fois IKK- β et TRAF6, ce qui suggère que GRA15 agit soit en amont ou sous la forme d'un complexe avec ces protéines. GRA15 conduit aussi à l'expression de régulateurs ayant un feed back négatif sur la voie de signalisation de NF- κ B, l'A20 désubiquitination enzyme (TNFAIP3) et le CYLD, qui ont pour fonction de limiter rapidement l'activation de NF- κ B. Or TRAF6 et le complexe IKK sont les deux cibles de ces enzymes de désubiquitination, il est ainsi probable que GRA15 agisse de concert avec ces protéines plutôt qu'en amont (Sun, 2008).

11. Interactions de différents facteurs parasitaires avec la voie de signalisation de NF- κ B

Une souche de type II arborant une ROP16_I peut inhiber l'activation de NF- κ B. Mais les modalités de modulations de NF- κ B par ROP16 est peu claire, mais il est probable que ce soit par l'intermédiaire de son activation de STAT6 et / ou de STAT3 (Ohmori et Hamilton, 2000, Nelson *et al.*, 2003, Butcher *et al.*, 2005, Hoentjen *et al.*, 2005). Cette inhibition a des conséquences importantes, par exemple, GRA15 et ROP16 ont des effets opposés sur les niveaux d'expression de nombreux gènes, y compris l'IL-12, une cytokine particulièrement important dans le contrôle de l'infection par *T. gondii* (Gazzinelli *et al.*, 1994, Saeij *et al.*, 2007). En fait, la différence d'un seul acide aminé dans ROP16 conduit cette protéine à être moins active lorsqu'elle est exprimée dans les souches de type II (Yamamoto *et al.*, 2009). GRA15 et ROP16 pourraient avoir des effets additifs ou synergiques sur l'expression d'autres gènes, tels que les gènes SOCS. Dans tous les cas, la

modulation de l'expression des gènes de la cellule hôte dépend de la combinaison exacte allélique d'une variété de facteurs de *T. gondii* possède, y compris GRA15 et ROP16.

Au début de l'infection (jours 1 à 5), GRA15 affecte la production des cytokines et la croissance du parasite *in vivo*. Quand un hôte est infecté par des souches de type II, GRA15 active NF- κ B dans les cellules hôtes et induit la sécrétion d'IL-12, tandis que l'infection par des souches de type II ou de type GRA15KO I / III ne provoque pas cette activation précoce. L'IL-12 produite stimule les cellules NK et les lymphocytes T provoquant la sécrétion d'IFN- γ . Or l'IFN- γ est le principal médiateur de résistance de l'hôte contre *T. gondii*, et les différences dans les niveaux de production d'IFN- γ sont cruciales en termes d'immunopathologie et de croissance parasitaire.

Toutefois, comme l'infection progresse et que les parasites libres se retrouvent hors des cellules-hôtes, d'autres facteurs parasitaires sont libérés comme la profiline et la cyclophiline (Denkers *et al.*, 2003). Ils activent NF- κ B *via* les voies TLR11 et 12 et CCR5. A ce stade, la production d'IL-12, d'IFN- γ et la croissance parasitaire sont alors indépendants du locus GRA15, ce qui pourrait expliquer pourquoi une souche de type II diffère peu dans sa virulence globale lorsqu'elle est GRA15KO *in vivo*. Il a été aussi montré que la croissance est également perturbée chez la souris infectée par une GRA15KO parasite *in vitro* chez la souris tout du moins. GRA15II peut également avoir d'autres effets *in vivo* qui ne sont pas encore connus. L'activation de NF- κ B par GRA15II augmente l'expression des chimiokines et de nombreuses molécules d'adhésion, impactant probablement la migration des cellules hôtes (Lambert *et al.* , 2006, 2009). L'activation de NF- κ B par *T. gondii* pourrait aussi augmenter la transcription des

séquences rétrovirales avec le VIH (Gazzinelli *et al.*, 1996) ou conduire à la création d'un environnement pro-inflammatoire de type Th1 favorisant les manifestations immunopathologiques. (Hunter et Remington, 1994, Liesenfeld, 1999).

ROP18 est l'autre facteur de transcription qui peut agir de façon concomitante dans la voie de signalisation de NF- κ B des cellules hôtes. Elle possède un domaine kinase actif, essentiel pour assurer une croissance parasitaire rapide et l'induction de la virulence chez la souris (El Hajj *et al.*, 2007). Elle est exprimée à la surface de la MVP et est directement exposée au cytosol de la cellule-hôte ce qui en fait un excellent candidat impliqué dans les modifications des voies de signalisation cellule-hôte qui ont été observées. Cependant, les essais *in vitro* n'ont pas mis en évidence de protéines-hôtes phosphorylées par ROP18. En relation avec un rôle indirect dans la modulation des voies de signalisation de la cellule-hôte, ROP18 phosphoryle une protéine parasitaire inconnue de 70 kDa (El Hajj *et al.*, 2007). La recherche de substrats de ROP18, leur implication dans des voies de signalisation et les changements qu'ils peuvent entraîner dans l'expression des gènes de la cellule-hôte devrait permettre d'expliquer comment ROP18 oriente la croissance parasitaire et la virulence. Ainsi un premier substrat de la kinase de ROP18 a été détecté. ROP18 de type I a été ainsi rendu responsable de l'inhibition de la voie de signalisation de NF- κ B des cellules hôtes et de la suppression de la production des cytokine pro-inflammatoire par la dégradation de p65 de la voie du NF- κ B (Du *et al.*, 2014).

En conclusion, au moins trois protéines du parasite sont capable de réguler finement la voie NF- κ B. Il est donc nécessaire de mettre les relations hôte-pathogène tant au niveau

de la régulation de la cellule hôte que de celui de la réponse immunitaire sous la lumière
du génome complexe des souches de ce parasite.

Chapitre III : *Toxoplasma gondii* et le facteur de transcription UHRF1

1. Le facteur de transcription UHRF1

UHRF1 (Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1) est une protéine nucléaire de 90 kDa et 793 acides aminés identifiée, en 2000, comme un facteur de transcription se liant à la CCAAT box du promoteur de la *topoisomérase 2a* et régulant son expression (Hopfner *et al.*, 2000).

UHRF1 est une protéine multi-domaine contenant : un domaine N-terminal ubiquitin-like ; un domaine Tadem Tudor (TTD) et un domaine PHD, par lesquels il interagit avec les histones méthylées, la protéine du rétinoblastome (pRB) et DNMT1 (DNA méthyltransférase 1) ; un domaine SRA qui interagit avec l'ADN hémi-méthylé, DNMT1 et HDAC1 (histone désacétylase 1) ; et un domaine RING finger qui a une activité ubiquitine E3 ligase (Figure 18).

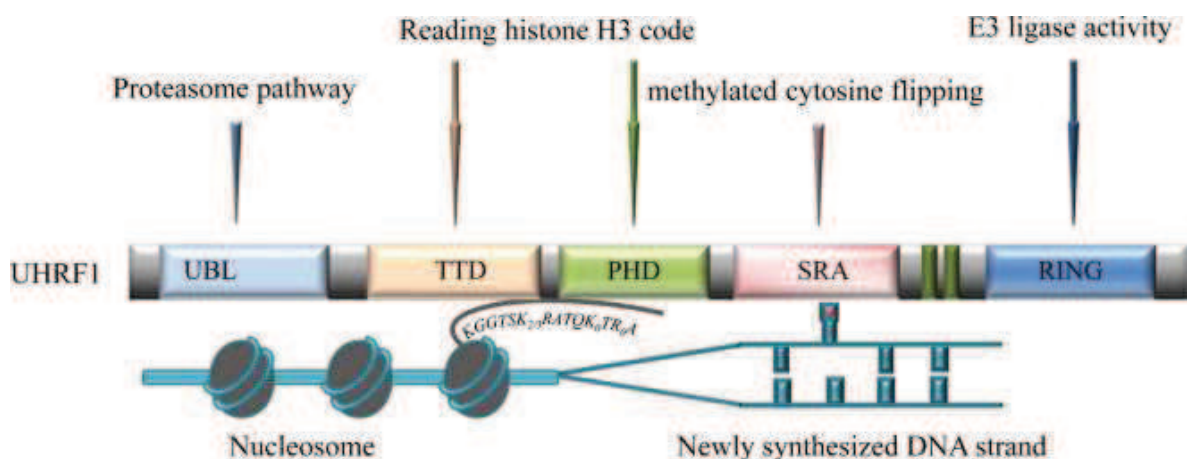


Figure 17 : Rôle fonctionnel des domaines d' UHRF1. Le rôle du domaine ubiquitin-like (UBL) n'est toujours pas élucidé, mais il serait susceptible d'être impliqué dans la voie de dégradation par le

protéasome. Le domaine PHD (*Plant Homeo Domain*) agit avec le TTD (*Tandem Tudor domain*) pour lire l'histone H3. Le domaine SRA (*Set and Ring Associated*) se lie aux cytosines méthylées (base rouge). Le domaine RING (*Really Interesting New Gene*) possède une activité ubiquitine ligase E3 (Bronner *et al.*, 2013).

UHRF1 est exprimée exclusivement dans les cellules en prolifération et/ou dans les cellules indifférenciées mais jamais dans les cellules quiescentes. UHRF1 est fortement exprimé dans le foie fœtal, les poumons et le cœur qui sont des tissus peu différenciés ou en prolifération, alors qu'il n'est pas exprimé dans les tissus bien différenciés comme le système nerveux central. UHRF1 est surexprimé dans les cellules cancéreuses (Hopfner *et al.*, 2000).

2. Fonctions d'UHRF1

2.1 Régulation du cycle cellulaire

UHRF1 est indispensable à la progression du cycle cellulaire des cellules non cancéreuses. Une déplétion d'UHRF1 empêche le passage en phase S du cycle cellulaire, alors qu'une surexpression d'UHRF1 induit une augmentation du pourcentage de cellules en phases S et G2 / M (Bonapace *et al.*, 2002, Jeanblanc *et al.*, 2005). De plus, UHRF1 voit son expression varier au cours du cycle cellulaire avec un pic en fin de phase G1 et au cours de la phase G2/M (Mousli *et al.*, 2003).

La régulation du cycle cellulaire est composée de multiples combinaisons de complexes cycline/CDK ou à chaque cycline correspond une sous-unité activatrice de sa CDK apparentée. La régulation du cycle cellulaire est contrôlée de façon très précise puisque

toute dérégulation conduit le plus souvent au développement de cellules cancéreuses. L'activité des CDK est fluctuante au cours du cycle cellulaire et dépendante des fluctuations dans l'abondance des cyclines. Les cyclines D et E sont impliquées dans la transition G1/S du cycle cellulaire. En réponse à un stimulus mitogène, la quantité de cycline D augmente et forme un complexe avec CDK4/6 conduisant à la phosphorylation de la protéine pRB. Ceci permet la libération du facteur de transcription E2F et la progression du cycle cellulaire en phase S. De plus, E2F induit une augmentation de la cycline E qui se lie à CDK2. Parmi les cyclines mitotiques (cyclines A et B), la cycline A est exprimée pendant la phase S et au début de la phase M et forme des complexes avec CDK1 et 2. La cycline B est présente de la phase G2 à la phase M du cycle cellulaire et forme un complexe avec CDK1. Le complexe cycline A/CDK2 contrôle la réplication de l'ADN, alors que les complexes cycline A/CDK1 et cycline B/CDK1 coopèrent durant les phases d'initiation et d'achèvement de la division cellulaire mitotique. Les Cdk sont inhibées par des protéines inhibitrices, les CKI (Cdk Inhibitor) comme p16, p21, p27 (Figure 19).

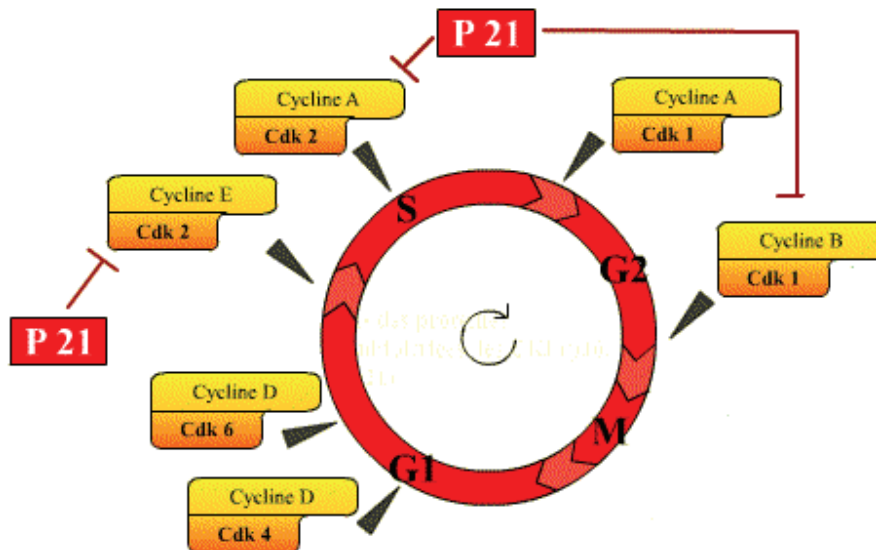


Figure 18: Régulation du cycle cellulaire (<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecellBM/index.htm>).

UHRF1 est capable d'interagir avec certaines protéines clés du cycle cellulaire comme p21, p53, pRB (retinoblastoma 1 protein), PCNA (proliferating cell nuclear antigen), le gène de la *Topo II α* , Cyclin (A2 and B) et les cyclin-dépendant kinases 1 et 2 (CDK1 and CDK2). UHRF1 est de plus régulé par des phosphorylations induites par certaines kinases dont les complexes cycline A/CDK2 et cycline B/CDK1 contribuant à la progression du cycle cellulaire (Kim *et al.*, 2009, Jeanblanc *et al.*, 2005, Hopfner *et al.*, 2000, Ma *et al.*, 2012, Tien *et al.*, 2011, Arima *et al.*, 2004).

2.2 Epigénétique

L'épigénétique désigne les changements héréditaires dans le phénotype ou l'expression des gènes causés par des mécanismes autres que des changements dans la séquence de l'ADN. Ceci inclut la méthylation de l'ADN et modifications des histones, qui influencent l'expression des gènes, et joue un rôle central dans la régulation de la différenciation et du développement.

En raison de sa capacité à faire le lien entre la méthylation de l'ADN et la méthylation de l'histone H3, UHRF1 est l'un des principaux effecteurs impliqué dans le modulations épigénétiques.

Le contrôle de l'expression d'un gène dépend en partie au moins, de l'état de méthylation des résidus cytosine de l'ADN. Une fois établie, la méthylation de l'ADN est le plus souvent stable pendant la mitose en particulier parce que maintenue après la réplication par Dnmt1 (DNA methyltransferase). Il est maintenant bien établi que ceci se fait avec l'aide de PCNA et d'UHRF1 (Bronner *et al.*, 2010, Bostick *et al.*, 2007, Sharif *et al.*, 2007). Il semble qu'UHRF1 ait une plus grande affinité pour les séquences méthylées (Unoki *et al.*, 2004) et peut se lier aux CpG méthylés par son domaine SRA (Unoki *et al.*, 2004). UHRF1 faciliterait le recrutement de Dnmt1 aux sites appropriés du brin d'ADN nouvellement synthétisé.

Les modifications des histones sont catalysées par les deux types d'enzymes qui présentent des effets antagonistes spécifiques. Par exemple, les Histones Acétyltransférases (HAT) acétylent les lysines, tandis que les Histones Désacétylases (HDAC) dé-acétylent les lysines. L'histone H3 est l'histone la plus souvent méthylée.

Elle peut être méthylée sur la lysine ou l'arginine. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle d'UHRF1 dans la méthylation des histones. En effet, il a été montré qu'UHRF1 était capable d'interagir avec H3K9 *via* son domaine de PHD. Plus récemment, Rottach *et al.* et Nady *et al.* ont montré que le domaine TTD était capable de se lier à H3K9 méthylée (Karagianni *et al.*, 2008, Nady *et al.*, 2011, Rottach *et al.*, 2010).

En 2012, Xie *et al.*, ont proposé un modèle pour expliquer l'implication d'UHRF1 dans la propagation de la méthylation sur la lysine 9 de l'histone H3 lors de la réplication de l'ADN. UHRF1, par l'intermédiaire des domaines TTD et PHD, se lie à H3K9me3 ce qui stimulerait l'activité enzymatique des méthyltransférases à méthyler les lysines 9 des histones H3 des nucléosomes voisins. De plus, la méthylation de l'ADN et d'H3K9 se renforcerait mutuellement pour assurer la stabilité de la chromatine dans un état hétérochromatinique et ceux grâce au complexe multienzymatique répressif associé à UHRF1 (PCNA, HDAC1, DNMT1, H3K9MT...).

2.3 Cancers

UHRF1 est également impliqué dans un grand nombre de phénomènes physiologiques et pathologiques, allant de l'embryogenèse, la migration cellulaire au développement et la progression de certains cancers. Son expression dépend de la nature des tissus : il n'est pas exprimé dans les tissus hautement différenciés, alors que, dans les tissus en prolifération, UHRF1 est particulièrement surexprimé (Hopfner *et al.*, 2000). Dans les cellules humaines non cancéreuses, l'expression UHRF1 fluctue avec le cycle cellulaire et culmine à la fin de phase G1 et au cours de la phase G2/M (Mousli *et al.*, 2003).

Cependant, dans les cellules cancéreuses, UHRF1 est surexprimé dans certains tissus comme notamment le sein, le poumon, la vessie, pancréas, côlon, prostate. Des niveaux élevés d'UHRF1 observés maintiennent les cellules dans un état de prolifération constant et empêchent leur différenciation (Bronner *et al.*, 2013).

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle joué par UHRF1 dans le processus de cancérogenèse en induisant une hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs. En effet, UHRF1 est impliqué dans la dérégulation de gènes connus pour jouer un rôle important dans la carcinogenèse comme BRCA1, p16^{INK4A}, p73, et de la topoisomérase II α (Hopfner *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2012, Jin *et al.*, 2010).

De ce fait, récemment, de nombreuses études ont proposé que UHRF1 pourrait être utilisé pour le diagnostic et le pronostic de nombreux types de cancer. L'expression d'UHRF1 a été démontrée comme utile pour le diagnostic des adénocarcinomes du pancréas, associée à un pronostic létal dans les cas de cancer colorectal ou encore associée à la progression maligne dans le cancer de la vessie (Lorenzato *et al.*, 2005, Crnogorac-Jurcevic *et al.*, 2005, Hervouet *et al.*, 2010, Sabatino *et al.*, 2012, Unoki *et al.*, 2009).

Une down-régulation d'UHRF1 permet une réexpression de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs. Ceci, fait d'UHRF1 une cible thérapeutique intéressante, la difficulté résidant dans la manière de cibler UHRF1. De nombreuses études démontrent que cibler UHRF1 pourrait avoir des effets thérapeutiques prometteurs. Premièrement, tout composé anti-cancéreux naturel testé et impliquant une régulation des gènes suppresseurs de tumeur, implique également une régulation de UHRF1 (Alhosin *et al.*,

2010, Achour *et al.*, 2013, Alhosin *et al.*, 2011, Krifa *et al.*, 2013). En outre, UHRF1 présente des propriétés anti- apoptotiques dans les cellules cancéreuses qui sont le résultat du gene silencing de certains gènes suppresseurs de tumeurs comme p16^{INK4A} (Achour *et al.*, 2008, Alhosin *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2012).

2.4 L'infection par *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii est capable de modifier le fonctionnement de la cellule qui l'héberge en détournant à son profit les métabolismes de celle-ci afin de s'y multiplier et établir une infection chronique. De précédents travaux réalisés au sein de l'équipe ont montraient que le parasite induisait un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 et une inhibition de la prolifération des cellules-hôtes infectées. La cause majeure du blocage du cycle cellulaire en phase G2/M est la diminution d'expression de la cycline B (Brunet *et al.*, 2008). Cette diminution est elle même due à la régulation épigénétique exercée par le recrutement d'UHRF1 et d'un complexe multienzymatique au promoteur du gène de la *cycline B*.

Parallèlement, nous avons mis en évidence que la facteur de transcription UHRF1, dont l'expression est modulée lors de l'infection, était indispensable à la prolifération parasitaire (Brunet *et al.*, 2008). Seul HIF1 était connu comme étant indispensable à la prolifération parasitaire et ce dans des conditions d'hypoxie. Il pourrait être impliqué dans la croissance parasitaire de par les gènes qu'il régule et qui sont impliqués dans la survie cellulaire, le métabolisme du fer et du glucose et la prolifération cellulaire (Spear *et al.*, 2006).

La nature des gènes régulés par UHRF1 ainsi que la régulation d'UHRF1 par des facteurs cellulaires et/ou parasitaires dans le cadre de l'infection par *T. gondii* reste encore à déterminer.

OBJECTIFS ET MOYENS

Nous avons pu observer que *T. gondii* interfère avec les voies de signalisation des cellules-hôtes et altère de nombreux phénomènes physiologiques comme la différenciation, l'apoptose et la prolifération. NF- κ B est un facteur de transcription dont l'activité est modulée au cours de l'infection (Molestina *et al.* 2003, 2005, Rosowski *et al.*, 2011, Du *et al.*, 2014). *T. gondii* entraîne une translocation nucléaire de NF- κ B ainsi que son activation, conduisant à une up-régulation de gènes-cibles impliqués dans des fonctions anti-apoptotique, pro-inflammatoire ou dans la survie cellulaire. Plusieurs études montrent qu'il existerait des différences en fonction des souches, dans la cinétique d'activation de NF- κ B (Rosowski *et al.* , 2011, Jensen *et al.*, 2013, Yang *et al.*, 2013). UHRF1 est un autre facteur de transcription dont l'expression est modulée par le parasite. L'activation d'UHRF1 a pour conséquence un effet sur la prolifération cellulaire, la modulation de certains gènes de la cellule-hôte et sur la prolifération parasitaire. Cependant, les mécanismes par lesquels *T. gondii* module l'expression d'UHRF1 ne sont pas encore caractérisés. Ils pourraient impliquer une régulation faisant intervenir un facteur de transcription-hôte régulant l'expression d'UHRF1 et/ou un ou plusieurs facteurs parasitaires capables directement ou indirectement de moduler l'expression d'UHRF1. Des résultats préliminaires ont montré que lors d'une infection par *T. gondii* (souche RH de type I), NF- κ B était capable de se lier au promoteur du

gène *uhrf1* et donc qu'il pourrait être un régulateur de ce gène dans le cadre d'une infection toxoplasmique.

UHRF1 joue un rôle central dans la régulation de certains gènes-hôtes (cycline B contrôlant la prolifération de la cellule hôte et probablement de cytokines proinflammatoires) et dans la prolifération parasitaire. La connaissance des mécanismes de régulation de ce gène par *T. gondii* est donc importante. Nous avons émis l'hypothèse que NF- κ B, contrôlé par *T. gondii*, pourrait être impliqué dans l'activation d'UHRF1 observée dans les cellules infectées. De plus, la virulence des souches s'illustrant notamment par une capacité différente à moduler les voies de signalisation de la cellule-hôte et notamment celle impliquant le facteur de transcription NF- κ B, il nous paraît intéressant d'inclure dans cette étude une analyse de l'importance de la variabilité des souches sur le couple NF- κ B/ UHRF1.

Nos objectifs sont de :

- 1. Caractériser l'influence de la virulence de la souche de *Toxoplasma gondii* sur la régulation d'UHRF1**
- 2. Déterminer le rôle de NF- κ B dans la cascade d'activation du facteur de transcription UHRF1 dans une cellule infectée par *Toxoplasma gondii*.**
- 3. Déterminer l'impact potentiel de la régulation d'UHRF1 via NF- κ B sur le cycle cellulaire de la cellule hôte.**

Ces objectifs seront mis en œuvre *in vitro* dans un modèle cellulaire utilisant des cellules trophoblastiques humaines BeWo, hormonosécrétantes et à potentiel syncytial. Ce modèle cellulaire est un modèle largement utilisé au sein de notre laboratoire notamment pour étudier le passage transplacentaire du parasite et dans lequel *T. gondii* prolifère et persiste (Pfaff *et al.*, 2005). L'ensemble de ce travail a été réalisé avec les souches RH de type I virulente, Pru de type II avirulente et LEF atypique de *T. gondii*.

Pour étudier la modulation différentielle des facteurs de transcription UHRF1 et NF- κ B en fonction des souches parasitaires, nous utiliserons les techniques : **a)** de cytométrie en flux et microscopie optique pour étudier la prolifération parasitaire dans notre modèle cellulaire ; **b)** de western blot en séparant les fractions nucléaires et cytoplasmiques des extraits protéiques pour analyser l'activation de NF- κ B dans notre modèle cellulaire , ainsi que de microscopie à fluorescence pour étudier la translocation nucléaire de NF- κ B; **c)** de western blot, RT-PCR et luciférase pour analyser l'activation d'UHRF1 dans notre modèle cellulaire. Pour étudier l'implication de NF- κ B dans la régulation d'UHRF1 dans les cellules infectées, nous utiliserons les techniques : **a)** d'immunoprécipitation de la chromatine pour étudier la liaison de NF- κ B au promoteur d'*uhrf1* ; **b)** des inhibiteurs de l'activation d'NF- κ B pour analyser leurs effets sur l'activation et l'expression d'UHRF1 (Western blot, luciférase) ; **c)** par cytométrie en

flux et western blot, nous déterminerons les effets d'une absence d'activation d'NF- κ B sur le cycle cellulaire et l'expression de la cycline B, ces 2 éléments étant régulés par UHRF1 dans une cellule infectée par *T. gondii*. Dans cette partie de travail, toutes les cellules ont été traitées avec le peptide SN50 qui inhibe la translocation de NF- κ B, ce qui nous permettra d'étudier le rôle de NF- κ B dans la régulation d'UHRF1.

Les résultats de cette étude nous apporteront de nouvelles connaissances sur les interactions hôte-parasite, notamment en ce qui concerne la modulation du génome de la cellule-hôte par *T. gondii* et donc sa prolifération et sa persistance.

Article :

Implication of transcription factor UHRF1 and NF- κ B in the *Toxoplasma* strain-dependent regulation of host cell cycle and Cyclin B expression.

Kanjo G¹, Pfaff AW¹, Meckert L¹, Lang C¹, Sabou M¹, Candolfi E¹, Brunet J^{1#}.

¹Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg, EA7292, DHPI, Fédération de Médecine Translationnelle, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France.

Synthèse en français de l'article à soumettre

Les parasites intracellulaires obligatoires comprenant le phylum des Apicomplexa (*Plasmodium*, *Theileria* et *Toxoplasma*) sont parmi les pathogènes les plus importants chez l'Homme et les animaux domestiques. *T. gondii* est un parasite capable d'infecter un grand nombre d'animaux à sang chaud comprenant approximativement 30% de la population humaine dans le monde entier (Tenter *et al.*, 2000). Il existe un nombre limité de molécules actives sur *T. gondii* (spiramycine, sulfamides, pyriméthamine). Ces molécules ne sont efficaces que sur les formes parasitaires présentes lors de la phase aiguë de la maladie. Il n'existe aucun traitement visant la forme intracellulaire du parasite ni aucun vaccin chez l'homme. La nécessité de trouver de nouvelles voies d'intervention

afin de prévenir la prolifération parasitaire par des médicaments ou des vaccins est toujours d'actualité. *T. gondii* est un parasite intracellulaire obligatoire qui interfère avec les voies de signalisation des cellules-hôtes et altère de nombreux phénomènes physiologiques comme la différenciation, l'apoptose et la prolifération. Plusieurs facteurs de transcription voient leur activité régulée lors de l'infection : HIF1, NF- κ B, STAT3, EGR2 et UHRF1. Plusieurs études ont rapporté que *Leishmania* ou d'autres parasites tels que *T.gondii* interféraient avec l'activation des voies de signalisation de NF- κ B (Shapira *et al.*, 2002, 2004). Ainsi, lors de l'infection par *T. gondii*, 85% des gènes dépendant de NF- κ B sont up-régulés. *T. gondii* conduit entre autre, à la régulation positive des gènes liés à la survie et à la prévention de l'apoptose dans la cellule hôte infectée. La manipulation de la cascade de régulation de la voie NF- κ B par *T. gondii* semble liée à la localisation d'I κ B phosphorylée à la membrane de la vacuole parasitophore. Ceci suggère une implication de protéines parasitaires dans le recrutement et l'activation séquentiel du complexe I κ B kinase des cellules hôtes, induisant une phosphorylation d'I κ B α dans les cellules hôtes infectées par *T. gondii* et une translocation nucléaire de NF- κ B (Molestina *et al.*, 2005). Cependant, des études récentes ont montré que *T. gondii* pouvait également moduler directement la voie de NF- κ B par l'intermédiaire d'un facteur parasitaire sécrété lors de l'invasion de la cellule-hôte, GRA15 une protéine de granule dense (Rosowski *et al.*, 2011). La régulation de NF- κ B est donc également dépendante de la virulence de la souche de *T. gondii* infectante. Les souches de type II de *T. gondii* activent la voie de NF- κ B plus qu'une souche de type I ou de type III, cette différence étant le résultat de la protéine polymorphe GRA15. Avec ROP16, protéine des rhoptries, GRA15 est

responsable d'une grande partie des différences dans l'induction de la sécrétion d'IL-12 par les macrophages des souris infectées (Rosowski *et al.*, 2011).

Un autre facteur de transcription dont l'expression est modulée par le parasite est UHRF1 (Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1). Le facteur de transcription UHRF1 est activé lors de l'infection par *T. gondii* avec pour conséquence un effet sur la prolifération cellulaire et sur la modulation de certains gènes de la cellule-hôte. C'est également un des deux seuls facteurs de transcription connus à l'heure actuelle pour être indispensable à la prolifération parasitaire. Les mécanismes de régulation d'UHRF1 par le parasite restent à élucider.

UHRF1 étant un élément central dans la modulation du génome de la cellule-hôte et dans la prolifération parasitaire, l'objectif de cet article est donc de déterminer le mécanisme de régulation de ce facteur de transcription dans un contexte d'infection par *T. gondii*. Dans un travail précédent (Brunet *et al.*, 2008), nous avons montré qu'il y avait une liaison de NF- κ B au promoteur du gène *uhrf1* lors de l'infection par une souche de *T. gondii* de type I. Cette liaison de NF- κ B au promoteur du gène *uhrf1* suggère qu'il pourrait être un régulateur de l'expression de ce gène. Notre hypothèse de travail suggère que la translocation nucléaire de NF- κ B de la cellule-hôte serait responsable de l'activation du gène *uhrf1* lors d'une infection ; et d'autre part, la régulation d'*uhrf1* par NF- κ B dans les cellules infectées serait dépendre de la virulence des souches de *T. gondii*. L'inhibition chimique de la translocation nucléaire de NF- κ B sera responsable de l'inhibition de l'activité de promoteur de gène *uhrf1* et de son expression.

Les objectifs sont de trois ordres

1. Caractériser l'influence de la virulence de la souche de *T. gondii* sur la régulation du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire de la cellule hôte.
2. Déterminer l'impact potentiel de la régulation d'UHRF1 *via* NF- κ B dans les cellules infectées par *T. gondii*.
3. Déterminer le rôle de NF- κ B dans la cascade d'activation du facteur de transcription UHRF1.

L'ensemble de ce travail a été réalisé en disposant un modèle cellulaire trophoblastique BeWo, ainsi que une variété des souches de *T.gondii* ; une souche RH de type I, virulente, une souche Pru de type II, avirulente et une souche LEF atypique.

La première partie de mon travail nous a permis d'étudier la régulation du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire lors de l'infection par des souches de virulence variable (type I, type II et atypique) de *T.gondii*. Nous avons montré que, dans les cellules infectées par *T.gondii*, le parasite induisait un arrêt de la prolifération de la cellule hôte et induisant un arrêt en phase G2 du cycle cellulaire. Cette observation était corrélée à une diminution d'expression de la cycline B. Nous avons montré également l'influence de la virulence des souches de *T. gondii* sur la régulation de l'expression d'UHRF1. Avec une souche PRU de type II, avirulente et une souche RH de type I, virulente, nous avons comparé les cinétiques d'activation du promoteur du gène *uhrf1* dans les cellules infectées par ces deux souches. Nous avons ainsi observé une régulation différentielle de l'expression de ces deux facteurs de transcription en fonction de la nature des souches de *T. gondii*.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié la régulation de l'expression d'UHRF1 par NF- κ B dans les cellules infectées par *T. gondii*. Le parasite induit une augmentation d'expression du facteur de transcription UHRF1 en activant son gène. L'activation de NF- κ B et sa translocation nucléaire au cours d'une infection pourrait être responsable de l'activation du gène d'UHRF1. Nous avons montré que NF- κ B se fixe sur le promoteur du gène *uhrf1* lors d'une infection par *T. gondii*. L'activité d'UHRF1 est modulée lors de l'infection et varie en fonction de la virulence des souches. L'activation de NF- κ B est initiée par la phosphorylation d'I κ B dans les cellules infectées par les souches de *T.gondii*, ce qui conduit à son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome permettant ainsi une translocation de NF- κ B dans le noyau de la cellule.

Dans un troisième temps, nous avons étudié la régulation de l'expression d'UHRF1 *via* NF- κ B dans les cellules infectées par *T. gondii* après avoir bloqué de façon spécifique la translocation de NF- κ B. Ainsi, en utilisant un peptide bloquant le site de fixation de NF- κ B sur la membrane nucléaire, nous avons observé une absence d'activation du gène *uhrf1* dans les cellules infectées, suggérant que NF- κ B contrôle bel et bien l'expression du facteur de transcription UHRF1 lors de l'infection par *T. gondii*, quelle que soit la nature de la souche infectante.

Ces données devraient nous permettre de mieux comprendre les voies de signalisation aboutissant à l'activation des gènes régulant le cycle cellulaire et l'apoptose de la cellule hôte.

Implication of transcription factor UHRF1 and NF- κ B in the *Toxoplasma* strain-dependent regulation of host cell cycle and Cyclin B expression.

[Kanjo G](#)¹, [Pfaff AW](#)¹, Meckert L¹, [Lang C](#)¹, [Sabou M](#)¹, [Candolfi E](#)¹, Brunet J^{1#}.

¹Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg, EA7292, DHPI, Fédération de Médecine Translationnelle, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France.

Abstract:

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that interferes with signaling pathways of host cells and alters many physiological processes such as differentiation, apoptosis and proliferation. Our previous results showed that *T. gondii* induces a rapid G1/S transition of the host cell cycle and an arrest at the G2 phase through induction of Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1 (UHRF1). This modulation is essential for efficient intracellular parasite proliferation. An *in silico* analysis of the *uhf1* gene promoter identified nine potential binding sites for NF- κ B. We demonstrate here that *T. gondii* affects cell proliferation, cell cycle and cyclin B expression in a *Toxoplasma* strain dependent manner. NF- κ B binds to the *uhf1* gene promoter during infection. Chemical inhibition of NF- κ B translocation inhibits *uhf1* promoter activity and expression.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; cell cycle, NF- κ B; UHRF1; Cyclin B

Introduction:

Toxoplasmosis is a parasitic infection caused by the apicomplexan *Toxoplasma gondii*. The parasite infects all warm-blooded vertebrates, including humans (Tassi *et al.*; 2007; Tenter *et al.*, 2000). The life cycle of the parasite is complex, with the sexual reproduction only taking place in felid hosts (wild or domestic) (Jackson *et al.*, 1986). It is a zoonotic disease that presents a serious risk for pregnant women during first infection and immunocompromised patients. It has a cosmopolitan distribution and an estimated one third of the world population is infected with *T. gondii*. *T. gondii* multiplies inside the host cell, within a parasitophorous vacuole (PV) formed immediately upon cell invasion allowing to escape the control of the immune system. The parasites remain in latent form throughout the lifetime of their hosts. Modulation of the NF- κ B signaling pathway in host cells is a crucial target for maintaining this lifelong latency. NF- κ B regulates the transcription of several genes involved in the immune response, cell proliferation, survival and apoptosis of host cell (Ghosh and Karin ,2002; Karin and Lin, 2002, Tato and Hunter, 2002). Many bacteria and viruses inhibit the activation of NF- κ B and the recruitment of immune cells, which increased the survival of the pathogen. Other pathogens induce the activation of NF- κ B, which in turn inhibits apoptosis, an important defense against intracellular pathogens, and increased cell migration, allowing the recruitment of new host cells. NF- κ B also initiates inflammation that causes tissue damage, allowing pathogens to cross tissue barriers. Thus, depending on the host, the pathogen, and the site of infection, the regulation of the signaling pathway of NF- κ B may be beneficial either to the host or to the pathogen, or both of them.

Manipulation of the NF- κ B cascade by *T. gondii* was put first in relation to the localization of phosphorylated I κ B to the parasitophorous vacuole membrane (PVM). This suggests an

involvement of the parasite in recruitment and activation of the host cell's I κ B kinase (IKK) complex, probably using parasite kinases to phosphorylate I κ B α in infected host cells, suggesting a new mechanism of parasitic origin to manipulate the NF- κ B pathway (Molestina *et al*, 2005). NF- κ B activation by *T. gondii* is associated with the location of phosphorylated I κ B α at the membrane of the parasitophorous vacuole (PVM). This is mediated by the activity of the parasite kinase TgIKK, independent of host cell IKK. The study of Molestina *et al*, 2005 examined the roles of host cell IKK and TgIKK in the temporal modulation of the NF- κ B activation. Despite the presence of TgIKK activity at the PVM, the nuclear translocation of NF- κ B and gene expression requires the presence of host IKK.

Infection by *T. gondii* strains of type II, but not virulent or pauci-virulent type I or III, induced sustained activation of NF- κ B. Cells of different human and murine cell lines infected with different strains of *T. gondii* showed that nuclear translocation of the p65 subunit of NF- κ B occurs exclusively during infection with type II strains. GRA15, a dense granule protein, has been the first gene identified to activate NF- κ B (Saeij *et al*, 2011). GRA15 of type II parasites is necessary and sufficient for nuclear translocation of p65 and transcription mediated by NF- κ B host cells. GRA15II signaling pathway activates NF- κ B independently of the MyD88 and TRIF pathways, but depends on the TRAF6 route (Rosowski *et al*, 2011). The rhoptry protein ROP16 is another strain-dependent virulence factor. A type II strain containing ROP16I can also inhibit NF- κ B activation. How ROP16 inhibits the activation of NF- κ B is still unclear, but it is likely to be through activation of STAT6 and/or STAT3 pathways (Ohmori and Hamilton, 2000; Nelson *et al*, 2003; Butcher *et al*, 2005; Hoentjen *et al*, 2005). GRA15 and ROP16 have opposite effects on the expression levels of many genes, including IL-12, a major cytokine for the development of the protective IFN-gamma pathway (Carrera *et al*, 1994; Saeij *et al.*, 2007). In fact, the difference of

active and inactive forms of ROP16 could be localized to variation of a single amino acid (Yamamoto *et al.*, 2009). On the other hand, GRA15 and ROP16 may have additive or synergistic effects on the expression of other genes, such as SOCS genes. More recently, ROP18 which has a kinase domain was associated to the list of strain-dependent virulence factors (Saeij *et al.*, 2006, Taylor *et al.*, 2006). Recent evidence showed that the N-terminal part of ROP18 associate with the dimerization domain of p65. This activity of ROP18 is necessary for the degradation of p65 and suppression of NF- κ B activity. A knockout parasite strain for the type I ROP18 kinase site is unable to inhibit NF- κ B, resulting in increased production of IL-6, IL-12, and TNF- α in infected macrophages. We can therefore conclude that type I ROP18 is responsible for the inhibition of NF- κ B signaling pathway and the suppression of expression of pro-inflammatory cytokines, allowing the survival of the pathogen (DU Jian *et al.*, 2014). In all cases, the modulation of gene expression of the host cell depends on the exact combination of alleles of a variety of parasite factors, including GRA15, ROP16 and ROP18.

Previous studies have described the host cell cycle dependent entry of *T. gondii* through specific binding to a putative host cell receptor upregulated during S phase (Dvorak and Crane, 1981; Youn *et al.*, 1991; Grimwood *et al.*, 1996). *T. gondii* induces host cell cycle arrest at the G2 phase; the parasite can proliferate efficiently through UHRF1 induction, causing a rapid G1/S transition, and downregulation of cyclin B1, leading to G2 arrest (Brunet *et al.*, 2008). By analyzing the *uhrf1* gene promoter, we identified nine potential binding sites for NF- κ B. The present work investigated the regulation of UHRF1 by NF- κ B during *T. gondii* infection and its role on parasite persistence.

Materials and Methods:

Cell culture and parasite:

The human trophoblast cell line (BeWo) was obtained from the American Type Culture Collection (Mannassa, VA) and cultured in FK12 medium, supplemented with 10% heat inactivated FCS (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 10 U ml⁻¹ penicillin, 10 mg ml⁻¹ streptomycin (Invitrogen). The THP1 were obtained from American Type Culture Collection (Mannassa, VA). ThP1 cells were cultured in RPMI growth medium as described in the manufacturer's instructions. The cell cultures were kept at 37°C, 5% CO₂ and cell numbers were determined with a Neubauer cell counting chamber using a Trypan blue exclusion test.

Tachyzoites of the virulent RH strain of *T. gondii* were maintained in Swiss-Webster mice as previously described (Pfaff *et al.*, 2005). Briefly, mice were inoculated intraperitoneally; parasites were recovered 3 days later, washed twice in PBS and counted using the Trypan blue exclusion test before use. Microscopical observation showed a nearly complete absence of mouse cells in the samples. Pru and LEF strain of *T. gondii* were grown (*in vitro*) into THP1 cells cultured in RPMI cell culture medium, supplemented with 10% fetal calf serum inactivated (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 10 IU / ml penicillin and 10 mg / ml streptomycin (Invitrogen). Cell cultures were maintained at 37 ° C and 5% CO₂. Four to five days later, the Pru strain tachyzoites were recovered by centrifuging the cell suspension at 280g for 5 minutes. The parasites were then washed twice in PBS and counted using the trypan blue.

Chemicals and antibodies:

Polyclonal anti-*T. gondii* antibody was raised in New Zealand rabbits by several injections of 50 mg of soluble *T. gondii* antigen suspended in Freund's incomplete adjuvant. The IgG fraction of this serum was purified by chromatography on DEAE Trisacryl M and tested by ELISA (Cesbron-Delauw MF and Capron A., 1993). The anti-SAG1 mouse monoclonal antibody raised against the major surface antigen SAG1 of *T. gondii* was engineered in our laboratory according to the method of Rodriguez (Rodriguez *et al.*, 1985). The mouse monoclonal antibody (clone 1RC1C-10), raised against UHRF1, was engineered as described elsewhere (Hopfner *et al.*, 2000). The anti-p65, anti-I κ B-P, anti-cyclin B and anti-actin mouse monoclonal antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The anti-p50/P105 was obtained from Abcam (Abcam, CA). Propidium iodide, Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG were obtained from Invitrogen. Tween-20 and the protease inhibitor cocktail were purchased from Roche Diagnostics. Hoechst H33258 was purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin, France). The peptide SN50 obtained from (SIGMA) used as inhibitor for NF- κ B nuclear translocation was administered with a concentration of 0.25 μ g/ml for 1 hour before infection with *T.gondii*.

Flow cytometry:

BeWo cells are cultured in 6-well plates so as to bring 10⁵ cells per well, and then maintained at 37 °C and 5% CO₂ for 24 hours. When the cells were 80% confluent, they were infected with *T. gondii* strain with a ratio of 1:1. Kinetics of infection was applied to the cells after counting parasites and cells are maintained at 37 °C and 5% CO₂ for: (1, 3, 6, 12, 24) hours. The cells were then harvested using trypsin (Invitrogen) and washed 3 times with PBS. They are then fixed for 15 minutes on ice with 5% formaldehyde, washed with PBS and taken up in 1 mL of ethanol.

Infected cells kept in a freezer at -20 °C until the day of experience. Identification of infected cells is done by flow cytometry after incubation for 45 minutes at room temperature with polyclonal anti-*T. gondii*. The cells then washed twice with PBS and incubated for 45 minutes with Alexa 488-labeled secondary antibodies anti-rabbit Ig. To study the percentage of infection of *T. gondii*-infected BeWo cells, the cells were resuspended in 200 µL of PBT and pass flow cytometry. To study the cell cycle, the cells were incubated for 2 hours with 50 mg/mL propidium iodide and 50 mg/mL RNase at room temperature near the light. The cells were then labeled by the antibody Alexa anti-rabbit Ig for 45 minutes. Fluorescence was analyzed by flow cytometry (FACScan flow cytometer) of 30 000 cells and the data were analyzed with CellQuest software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

Western blotting:

BeWo cells were cultured in Petri dishes in order to put 10^6 cells per dish, and then maintained at 37 ° C and 5% CO₂ for 24 hours. When the cells were 80% confluent, they were infected with *T. gondii* with a ratio of 1:1. Kinetics of infection was applied to the cells after counting parasites and cells are maintained at 37 ° C and 5% CO₂ (1, 3, 6, 12, 24) h. The cells were then harvested using trypsin (Invitrogen) and washed twice with PBS and centrifuged at 280g for 5 minutes at 4 °C. The pellet was resuspended in 350 µL of protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Meylan, France) and subjected to ultrasonic 4 times 10 seconds with 1 minute break in the ice. The suspension was centrifuged at 10 000g for 20 minutes at 4°C. Blots were probed with 1 mg ml⁻¹ of anti-UHRF1, anti-IκB-P, anti-cyclin B, or anti-actin mouse monoclonal antibodies. Secondary peroxidase-conjugated antibodies were used at 0.16 mg ml⁻¹. Signals were visualized by chemiluminescence using the ECL detection system. A Chemidoc MP systems (BioRad,

Hercules, Ca, USA) and a related software imaging were used for analyzing the blots by densitometry.

Immunofluorescence

BeWo cells were cultured in 6-well plates on coverslips round glass (Dutcher, Brumath, France). For one part, cells were transfected with the plasmid GFP-P65 for 24 hours and then infected with *T.gondii* for different times of infection. For the other part, cells were infected for different times as indicated. For the tow part, cells were washed 3 times with PBS, then were fixed with paraformaldehyde for 10 minutes and then washed in PBS for 15 minutes. They are then permeabilized with Triton X-100 0.1% for 10 minutes. The strips are then saturated with a buffer containing 3% BSA and then labeled by incubation overnight with anti-P50 or anti-P65, washed and incubated for 45 minutes with secondary antibodies conjugated to Alexa fluor 546 rabbit or Alexa fluor488 rabbit. Cells were washed again 3 times with PBS for 15 minutes and incubated again with another primary antibody (anti-*T. gondii* IgG or anti-SAG1) for 2 hours, washes and incubated for 45 minutes with secondary antibody conjugated to Alexa fluor 488 rabbit or Alexa fluor 546 mouse. Cell transfected with the plasmid GFP-P65 were incubated with the primary antibody anti-SAG1 for two hours, washed with PBS and incubated with the secondary antibody Alexa fluor 546 mouse. Cells were washed again and incubated for 5 minutes with Hoechst (Sigma-Aldrich). After a final wash, the slides are mounted using a mounting fluid (Mowiol, Sigma-Aldrich) and then the fluorescence is observed with a Zeiss fluorescence microscope (Le Pecq, France). Data were acquired by a camera and Zeiss MRc5 analyzed using AxioVision software (Zeiss).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP):

BeWo cells were cultured in Petri dishes and then infected with *T. gondii* infection at a moi of 4/1. ChIP was performed according to the manufacturer's recommendations (ChIP-IT Express, Active Motif, CA). Fixing is achieved by adding complex formaldehyde for 10 min. The reaction was stopped by adding glycine. The cells were washed with cold PBS and harvested by scraping cell is. Cell pellets were then lysed for 30 minutes with cold Lysis Buffer, then transferred potter placed in ice and slowly crushed. The pellet containing the nuclei was resuspended in digestion buffer for 5 minutes at 37 ° C. The enzymatic digestion is carried out at 37 ° C for 30 minutes. The reaction is stopped by addition of EDTA. After centrifugation, the supernatant containing the fragmented chromatin was incubated with anti-NF-κB or anti-actin (as negative control) and magnetic beads at 4 ° C and stirred overnight. The beads were washed and incubated with 100 ml of elution buffer at 65 ° C for 2.5 hours.

Samples immunoprecipitated with anti-NF-κB are analyzed using UHRF1primers. The amplification includes a denaturation step at 95 ° C for 30 s, followed by 33 cycles (55 ° C, 30 s and 72 ° C, 30 s) and a step finale at 72 ° C for 7 min.

Luciferase assay:

Cells were transfected for 24 hours with 2 mg of plasmid pGL3-UHRF1-Luc then they are infected. The cells were harvested with 250 µL of Bright-Glo luciferase assay buffer (Promega, Dübendorf). The luciferase activity was measured using the Bright-Glo luciferase assay system (Promega). The results are expressed relative to the amount of protein (measured by the method of Bradford).

Parasites and Parasitophorous Vacuoles evaluation

BeWo cells were cultured in 6-well plates on coverslips round glass (Dutcher, Brumath, France) in order to put 10^5 cells per well, and then maintained at 37 ° C and 5% CO₂ for 24 hours. When the cells were 80% confluent, they were infected with *T. gondii* with a ratio of 1:1. Cells were washed 3 times with PBS, then were fixed with paraformaldehyde for 15 minutes and then washed in PBS for 20 minutes. BeWo cells were subjected to May-Grunwald-Giemsa (MGG) and washed in distilled water and mounted between a slide and a cover glass, and then the number of parasitophores vacuole per cell and the number of parasites per vacuole were counted by microscopy.

Statistical analysis:

Statistical analysis was performed using the Student t test. The data presented correspond to the mean \pm SEM of 3 experiments. A p value less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Kinetics of T.gondii infection efficiency depending on the parasite strain

We examined *T. gondii* proliferation after infection with different *T. gondii* strains: RH (Type I), Pru (Type II) and LEF (atypical) strains at a moi of 1:1. The infection efficiency was measured by flow cytometry (Fig. 1A) and by light microscopy analysis following May-Grünwald-Giemsa staining (Fig.1B and C). The *T. gondii* infection increased with time for all of the three analyzed strains. The percentage of infected cells increased from 18% after 1h of infection to 59% after 24h for RH strain, from 8% after 1h of infection to 31% after 24h for Pru strain and from 5% after 1h of infection to 42% after 24h for LEF strain. Light microscopy analysis showed that parasitophorous vacuoles contained 1 tachyzoïte after 1h of infection with all strains whereas parasitophorous vacuoles contained respectively at least 9, 6 and 3 tachyzoïtes for RH, Pru and LEF strains after 24h.

Strain dependent differential regulation of cyclin B expression and cell cycle in Toxoplasma-infected cells

Infection with the *T. gondii* RH strain results in UHRF1-dependant down regulation of cyclin B expression inducing a cell cycle arrest of infected cells in G2/M phase and an inhibition of cell proliferation (Brunet *et al.*, 2008). We analyzed cell cycle regulation in BeWo cells infected with strains of differential virulence. Figure 2A shows a decrease of cyclin B level after 6 hours of infection pour RH and Pru strains. With LEF strain, cyclin B expression decreased between 3 and 12 h, but increased again until at least 24h.

Cell cycle phase population of infected cells was analyzed by flow cytometry (Fig. 2B). We found that the percentage of cells in G2/M increased continually until 24h for RH and Pru strain, but

peaked at 3 h with LEF strain. This result was confirmed in Fig 2C by studying cell proliferation. Proliferation of cells infected with RH and Pru strain was inhibited, correlating with the cell cycle arrest. Surprisingly, for the LEF infected cells, despite the recovered cyclin B expression, proliferation was also absent.

Strain-specific activation and protein upregulation of UHRF1

We previously showed that *T. gondii* infection with RH strain results in up regulation of host UHRF1 protein which in turns controls Cyclin B and cell cycle progression (Brunet *et al.*, 2008). To compare the ability of type I, II, and atypical strains to regulate UHRF1 expression, BeWo cells were infected with RH, Pru and LEF strains, or left control cells uninfected. Protein analysis was performed by Western blot (Fig. 3A). Cells infected with either RH, Pru, or LEF all had higher levels of UHRF1 than uninfected cells. However, after 6 hours of infection, in cells infected with LEF strain, a drop of UHRF1 protein level was observed, while in RH and Pru infected cells, levels continued to increase until 24h of infection. Our results demonstrate that, while type I, II, and atypical *Toxoplasma* strains all increase the expression of UHRF1, type I, and II induced a sustained up regulation of host UHRF1 while with the atypical LEF strain, UHRF1 up regulation decreased after 6h of infection. We then analyzed transcriptional activity of UHRF1 using a reporter plasmid carrying luciferase driven by *uhrf1* promoter. Luciferase activities were measured after infection with RH, Pru and LEF strains in comparison to non-infected cells. RH-infected and Pru-infected cells exhibited an increase of luciferase activity (5-fold compared to non-infected cells) after 3 h post infection and 6 hours post infection respectively. In contrast, in LEF-infected cells, luciferase activity increased strongly at least until 24 hours (11-fold) (Fig. 3B). These data suggest that transcriptional activation is in part responsible for UHRF1 induction

during *T. gondii* infection, but a post-transcriptional regulation may also occur in LEF infected cells.

***T. gondii* activates UHRF1 via NF- κ B**

T. gondii differentially activates the NF- κ B signaling pathway in the infected host cell and leads to up regulation of survival genes, thus preventing the apoptosis of the host cell. Activation of NF- κ B is initiated by the degradation of proteins which occurs *via* the phosphorylation of I κ B regulatory domains, leading to their ubiquitination and subsequent proteasomal degradation. To monitor NF- κ B translocation, we infected BeWo cells with RH, Pru and LEF strains for 0 to 24 h and we have measured by Western blot phosphorylated-I κ B expression (Fig. 4A). RH infection induced the phosphorylation of I κ B between 3 to 6h post-infection while Pru infection induced a large I κ B α phosphorylation at 6h. Interestingly, infection with LEF parasites did not modulate I κ B α phosphorylation during 24h.

G2/M cell cycle arrest participates to that processes of host cell immortalization. UHRF1 which controls cell cycle in host cell has nine potential NF- κ B binding sites in its promoter. We hypothesized that *T. gondii*-mediated NF- κ B activation could modulate the expression of UHRF1. To test this hypothesis, we first analyzed NF- κ B binding to *uhf1* promoter in RH and Pru infected cells by ChIP (Fig.4 B and C). We observed a gradually enhanced NF- κ B binding to *uhf1* promoter during *T. gondii* infection with both RH and Pru strain.

Blocking NF- κ B translocation modifies UHRF1 expression in a strain dependent manner

To further establish whether NF- κ B is necessary for UHRF1 protein up-regulation and for *uhf1* activation, BeWo cells were treated with the cell permeable NF- κ B inhibitory peptide SN50

before infection with *T. gondii* (Fig. 5 and Fig 6). Non treated cells exhibited an increase of UHRF1 expression in infected cells, while SN50-treated cells exhibited little if any increase (Fig.5). These data were confirmed by luciferase activity (Fig.6).

These results suggest that NF- κ B is directly or indirectly involved in UHRF1 regulation in *T. gondii* infected cells and that NF- κ B positively regulates UHRF1 expression through recruitment on *uhrf1* promoter during *T. gondii* infection. This regulation is common to all three tested *Toxoplasma* strains.

References:

1. Brunet J, Pfaff AW, Abidi A, Unoki M, Nakamura Y, Guinard M *et al.* Toxoplasma gondii exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation. *Cell Microbiol* 2008; **10**(4): 908-920.
2. Butcher BA, Kim L, Panopoulos AD, Watowich SS, Murray PJ, Denkers EY. IL-10-independent STAT3 activation by Toxoplasma gondii mediates suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. *J Immunol* 2005; **174**(6): 3148-3152.
3. Carrera L, Chiaramonte M, Kuhn R, Muller W, Sacks D, Sher A *et al.* Leishmania major and Toxoplasma gondii have opposite effects on cytokine synthesis by macrophages. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; **89**(4): 649-650.
4. Du J, An R, Chen L, Shen Y, Chen Y, Cheng L, Jiang Z, Zhang A, Yu L, Chu D, Shen Y, Luo Q, Chen H, Wan L, Li M, Xu X, Shen J. 2014. Toxoplasma gondii virulence factor ROP18 inhibits the host NF-kappaB pathway by promoting p65 degradation. *The Journal of biological chemistry* 289:12578-12592.
5. Dvorak JA, Crane MS. Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites. *Science* 1981; **214**(4524): 1034-1036.
6. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002; **109 Suppl**: S81-96.

7. Grimwood J, Mineo JR, Kasper LH. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells is host cell cycle dependent. *Infect Immun* 1996; **64**(10): 4099-4104.
8. Hoentjen F, Sartor RB, Ozaki M, Jobin C. STAT3 regulates NF-kappaB recruitment to the IL-12p40 promoter in dendritic cells. *Blood* 2005; **105**(2): 689-696.
9. Hopfner R, Mousli M, Jeltsch JM, Voulgaris A, Lutz Y, Marin C *et al.* ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase IIalpha expression. *Cancer Res* 2000; **60**(1): 121-128.
10. Jackson MH, Hutchison WM. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv Parasitol* 1989; **28**: 55-105.
11. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002; **3**(3): 221-227.
12. Molestina RE, Sinai AP. Host and parasite-derived IKK activities direct distinct temporal phases of NF-kappaB activation and target gene expression following *Toxoplasma gondii* infection. *J Cell Sci* 2005; **118**(Pt 24): 5785-5796.
13. Nelson G, Wilde GJ, Spiller DG, Kennedy SM, Ray DW, Sullivan E *et al.* NF-kappaB signalling is inhibited by glucocorticoid receptor and STAT6 via distinct mechanisms. *J Cell Sci* 2003; **116**(Pt 12): 2495-2503.

14. Ohmori Y, Hamilton TA. Interleukin-4/STAT6 represses STAT1 and NF-kappa B-dependent transcription through distinct mechanisms. *J Biol Chem* 2000; **275**(48): 38095-38103.
15. Pfaff AW, Villard O, Klein JP, Mousli M, Candolfi E. Regulation of *Toxoplasma gondii* multiplication in BeWo trophoblast cells: cross-regulation of nitric oxide production and polyamine biosynthesis. *Int J Parasitol* 2005; **35**(14): 1569-1576.
16. Rodriguez C, Afchain D, Capron A, Dissous C, Santoro F. Major surface protein of *Toxoplasma gondii* (p30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes. *Eur J Immunol* 1985; **15**(7): 747-749.
17. Rosowski EE, Lu D, Julien L, Rodda L, Gaiser RA, Jensen KD *et al.* Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *J Exp Med* 2011; **208**(1): 195-212.
18. Saeij JP, Collier S, Boyle JP, Jerome ME, White MW, Boothroyd JC. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* 2007; **445**(7125): 324-327.
19. Saeij JP, Boyle JP, Collier S, Taylor S, Sibley LD, Brooke-Powell ET, Ajioka JW, Boothroyd JC. 2006. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* 314:1780-1783.
20. Taylor S, Barragan A, Su C, Fux B, Fentress SJ, Tang K, Beatty WL, Hajj HE, Jerome M, Behnke MS, White M, Wootton JC, Sibley LD. 2006. A secreted serine-threonine kinase

- determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* **314**:1776-1780.
21. Tassi P. *Toxoplasma gondii* infection in horses. A review. *Parassitologia* 2007; **49**(1-2): 7-15.
 22. Tato CM, Hunter CA. Host-pathogen interactions: subversion and utilization of the NF-kappa B pathway during infection. *Infect Immun* 2002; **70**(7): 3311-3317.
 23. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000; **30**(12-13): 1217-1258.
 24. Yamamoto M, Standley DM, Takashima S, Saiga H, Okuyama M, Kayama H *et al*. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *J Exp Med* 2009; **206**(12): 2747-2760.
 25. Youn JH, Nam HW, Kim DJ, Park YM, Kim WK, Kim WS *et al*. Cell cycle-dependent entry of *Toxoplasma gondii* into synchronized HL-60 cells. *Kisaengchunghak Chapchi* 1991; **29**(2): 121-128.

Figures legends:

Fig.1. Proliferation of *T. gondii* different strains in BeWo cells

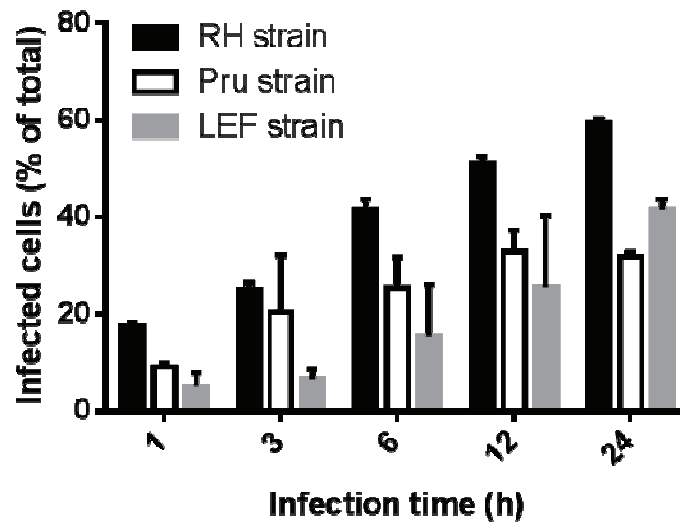
A. Cells were infected with *T.gondii* RH, Pru and LEF strains at a moi of 1:1 for the indicated times. Infection efficiency was determined by flow cytometry and expressed as percentage of total cells. Data are means \pm SEM of three separate experiments.

B. Cells were infected with *T.gondii* RH, Pru and LEF strains at a moi of 1:1 for the indicated times. Number of parasites per vacuole was determined after May-Grunwald-Giemsa (MGG) staining by optical microscopy. Data are means \pm SEM of three separate experiments.

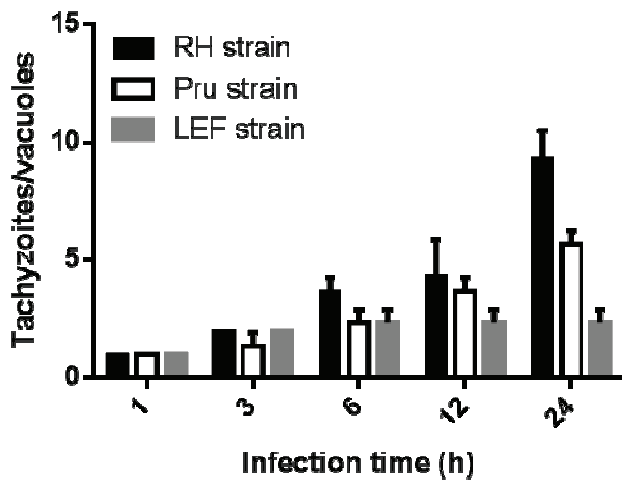
C. Cells were infected with *T.gondii* RH, Pru and LEF strains at a moi of 1:1 for the indicated times. Numbers of vacuoles per cells were determined after MGG staining by optical microscopy. Data are means \pm SEM of three separate experiments.

Figure 1

A



B



C

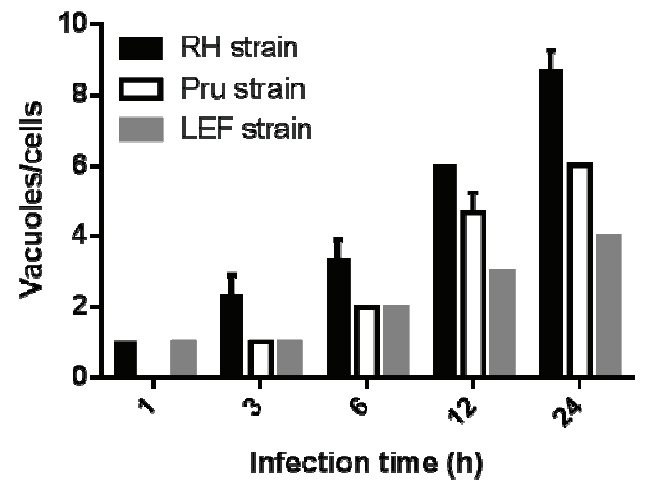


Fig.2. Effect of *T. gondii* strain virulence on host cell cycle regulation and cell proliferation

A. Cells were infected with *T.gondii* RH, Pru and LEF strains at a moi of 1:1 for the indicated times and cyclin B protein expression was analyzed by Western blotting using cyclin B antibody. Actin served as a control.

B. Cells were infected with *T.gondii* RH, Pru and LEF strains at a moi of 1:1 for the indicated times and cell cycle progression was analyzed by flow cytometry. The percentage of cells in each cell cycle phase of uninfected control cells or *T. gondii*-infected cell population was analyzed using propidium iodide.

C. Cells were infected with *T.gondii* RH, Pru and LEF strains at a moi of 1:1 for the indicated times. Cells were harvested and living cells were counted using Trypan blue exclusion.

Figure 2

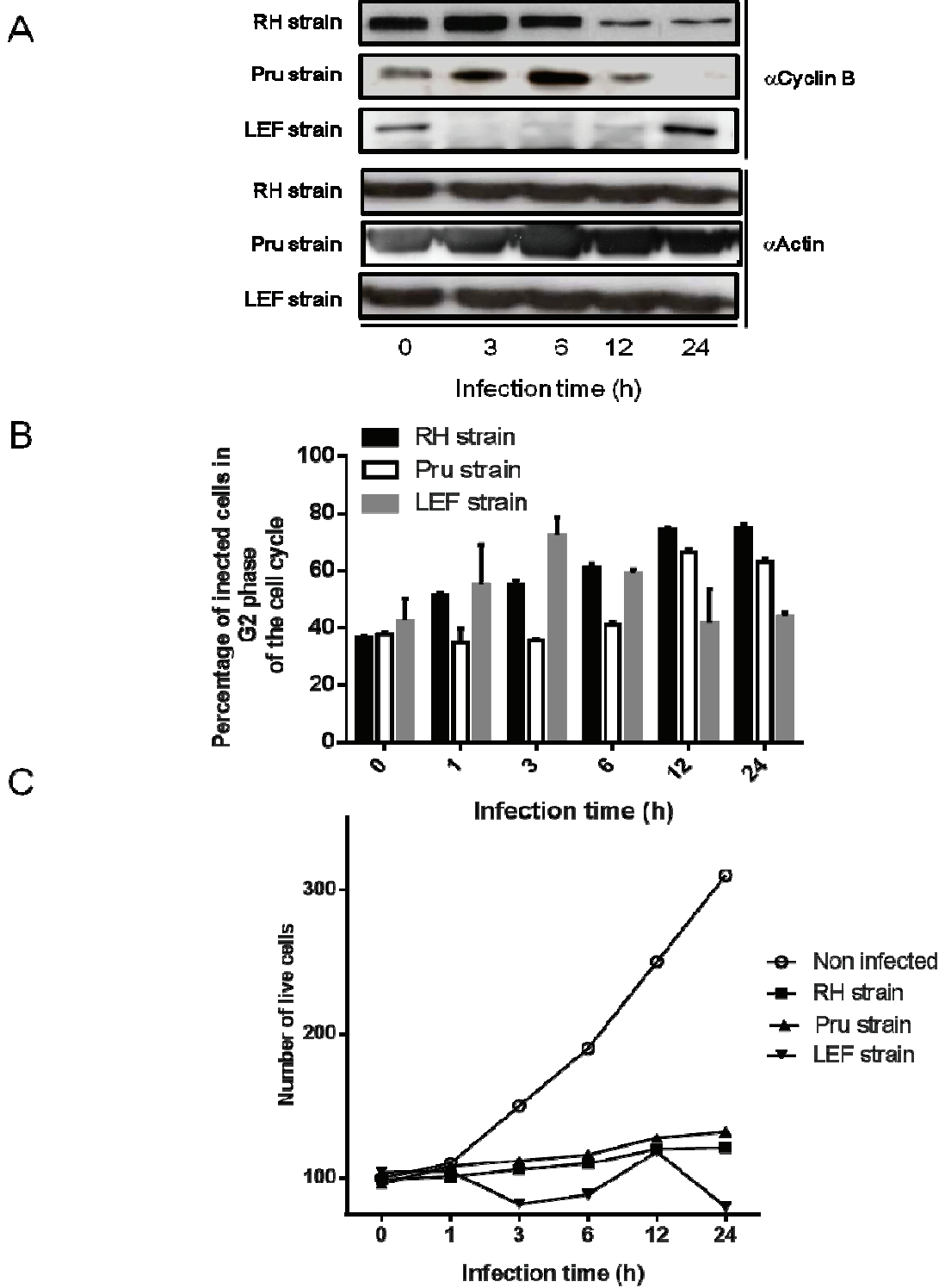


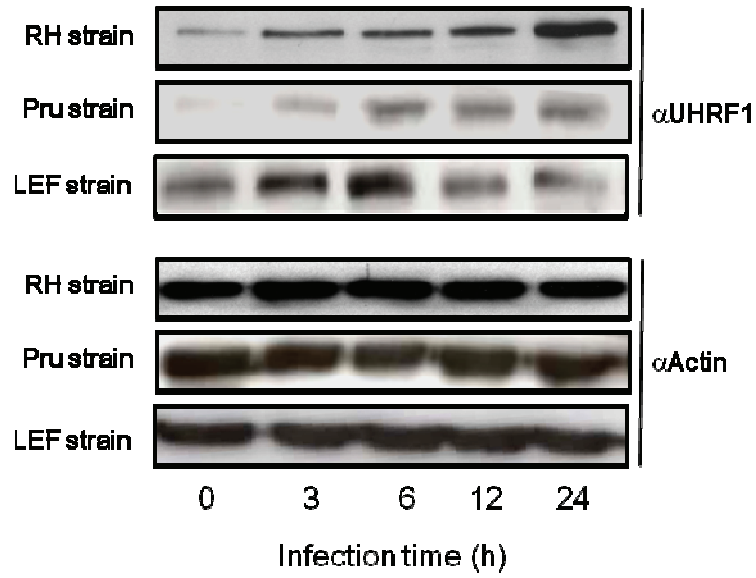
Fig.3. Strain-dependent UHRF1 expression in *T. gondii* infected cells

A. Cells were infected with *T.gondii* RH, Pru and LEF strains at a moi of 1:1 for the indicated times and UHRF1 protein expression analyzed by Western blotting using UHRF1 antibody. Actin served as a control.

B. Cells were infected with *T.gondii* RH, Pru and LEF strains at a moi of 1:1 for the indicated times and UHRF1 protein expression analyzed by lucifersae assay. Data are means \pm SEM of three separate experiments.

Figure 3

A



B

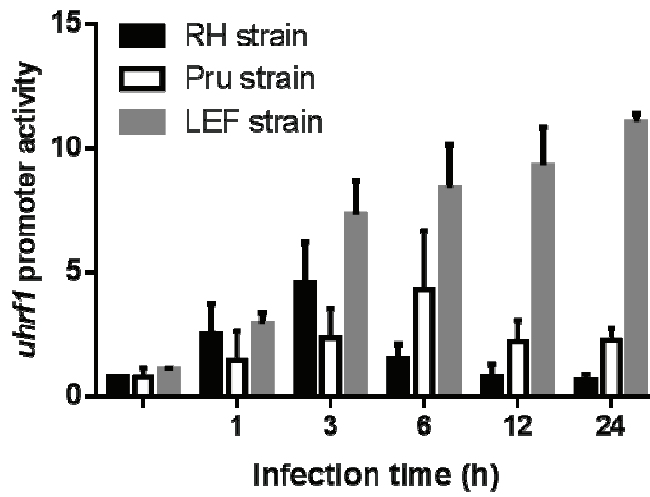


Fig.4. Binding of NF- κ B to *uhrf1* promoter in infected cells.

A. Cells were infected with *T.gondii* RH, Pru and LEF strains at a moi of 1:1 for the indicated times and I- κ B phosphorylation analyzed by Western blotting using I κ B-P antibody. Actin served as a control.

B+C. Cells were infected with type I *T. gondii* RH strain (B) or the type II Pru strain (C) for the indicated times at a moi of 4:1. ChIP assay was performed using antibodies against NF κ B-p65, or actin as negative control. Immunocomplexes were then analyzed by PCR specific for the promoter region of *uhrf1*. Non-immunoprecipitated chromatin material was used as input control. Data are representative of at least three independent experiments.

Figure 4

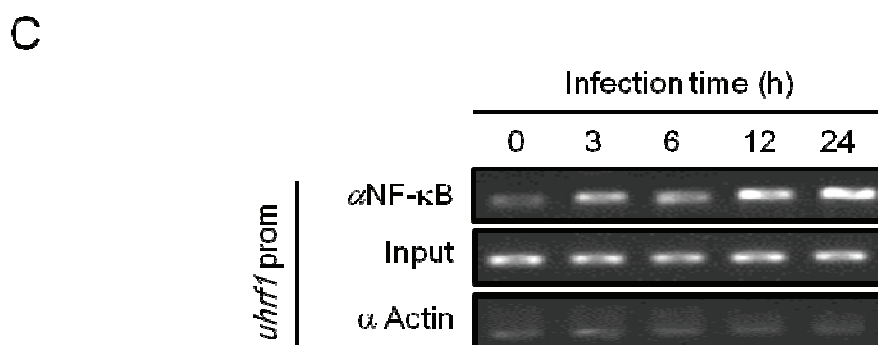
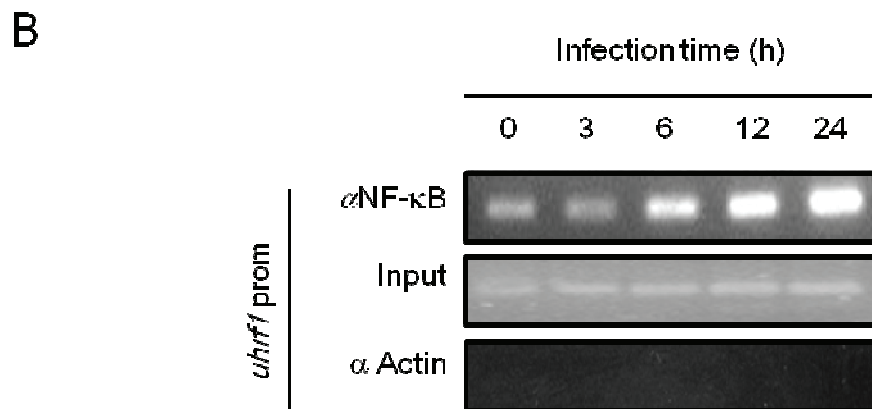
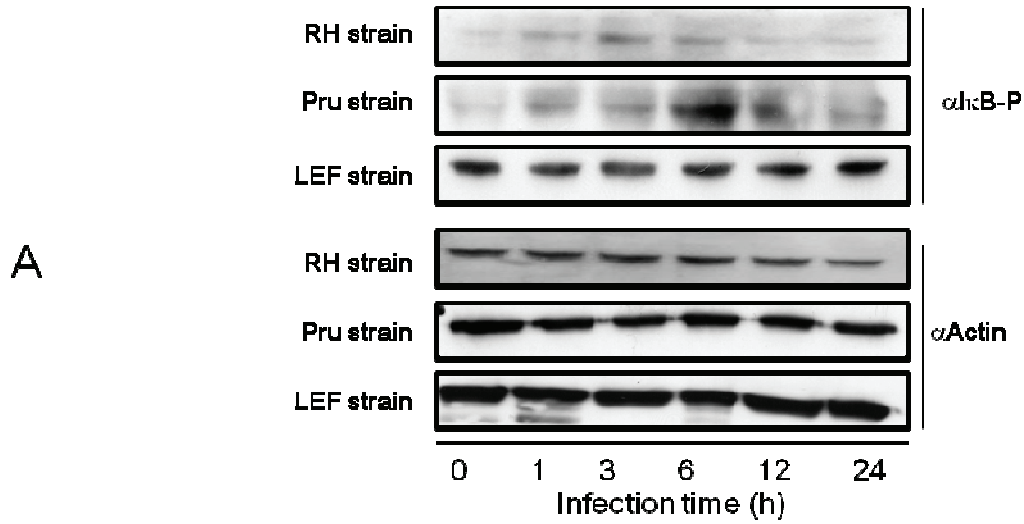


Fig.5. NF- κ B affects UHRF1 production

Cells were treated or not with SN50 and infected with *T.gondii* RH, Pru and LEF strains at a moi of 1:1 for the indicated times and UHRF1 protein expression was analyzed by Western blotting using UHRF1 antibody. Actin served as a control.

Figure 5

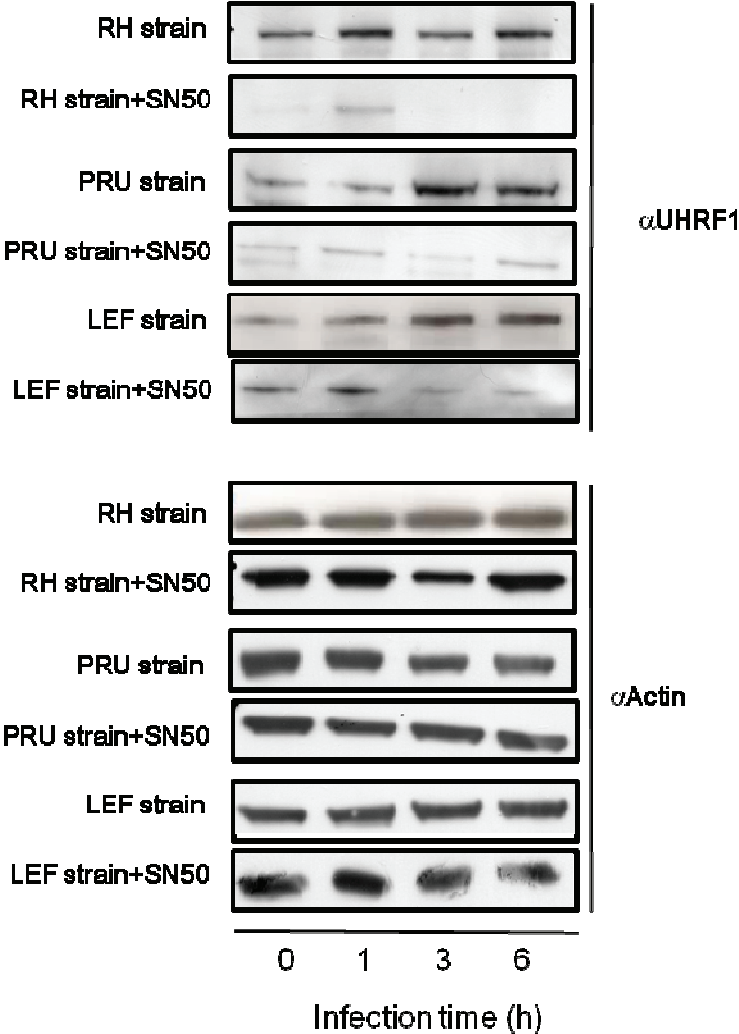
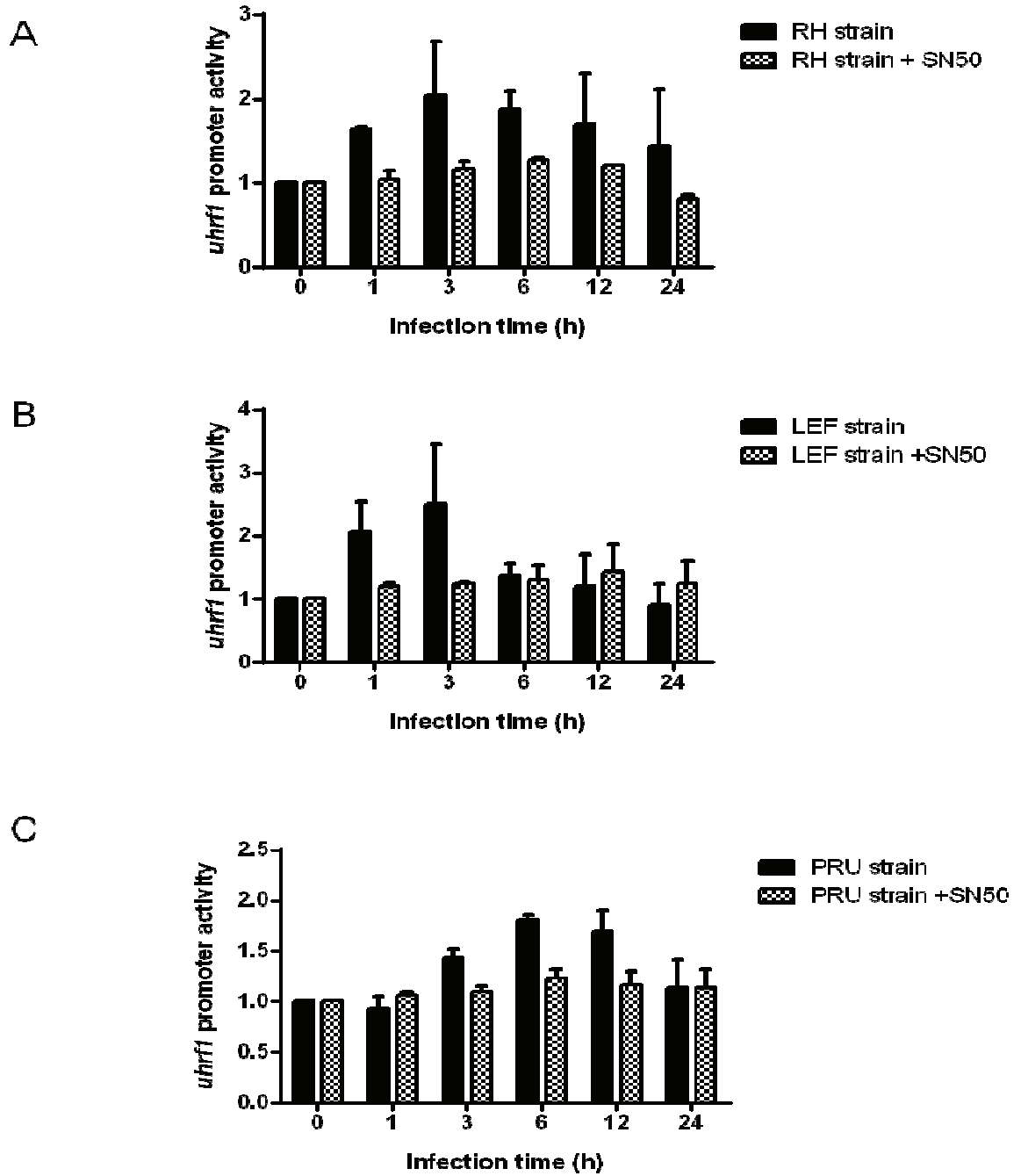


Fig.6. NF- κ B regulates UHRF1 activation in *T. gondii*-infected cells.

Cells were treated or not with SN50 to block NF κ B translocation and infected with *T.gondii* RH, Pru and LEF strains at a moi of 1:1 for the indicated times. UHRF1 protein expression was analyzed by lucifersae assay. Data are means \pm SEM of three separate experiments.

Figure 6



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

T. gondii est un parasite intracellulaire obligatoire cosmopolite capable d'infecter tous les animaux à sang chaud. Cette capacité à établir une infection chronique dans un tel spectre d'hôtes est liée à son aptitude à détourner à son profit de nombreuses fonctions des cellules qu'il infecte. Ainsi sont manipulés, les organelles intracellulaires, le cytosquelette de l'hôte, les voies de signalisation de l'apoptose ou encore la réponse immunitaire, lui permettant de créer un environnement favorable à sa réplication et à sa persistance.

Parmi les facteurs de transcription modulés par *T. gondii*, des travaux précédemment réalisés au sein du laboratoire ont montré que le facteur de transcription UHRF1, impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et jusqu'alors uniquement étudié dans les processus cancérogènes, était un élément central dans la régulation de l'expression génique des cellules infectées. Des travaux préliminaires ont montré que dans les cellules infectées par une souche *T. gondii* de type I, le parasite était capable d'activer UHRF1 et d'augmenter son expression et sa phosphorylation ; ceci ayant pour conséquence notamment une dérégulation du cycle cellulaire et un arrêt de prolifération des cellules infectées en phase G2/M. De plus, UHRF1 est un facteur indispensable à la prolifération parasitaire (Brunet *et al.*, 2008). La régulation de l'expression d'UHRF1 reste encore à déterminer. Il est fort probable qu'elle soit sous la dépendance d'autres facteurs de transcription. L'analyse *in silico* de ce promoteur a montré qu'il possédait 9 sites de fixation de NF- κ B. Or NF- κ B est connu pour être activé de façon différentielle lors d'une infection toxoplasmique (Melo, 2011). La modulation de ce facteur de transcription est

cruciale car il contrôle nombres de gènes impliqués dans la réponse immunitaire, la prolifération cellulaire, la survie et l'apoptose des cellules.

Afin de moduler les voies de signalisation des cellules hôtes, *T. gondii* est notamment capable de sécréter des protéines contenues dans des organelles sécrétoires spécifiques, les rhoptries et granules denses, retrouvés uniquement dans le phylum des Apicomplexa. Les protéines RON, ROP et GRA relarguées sont ensuite retrouvées soit dans le cytosol, soit dans le noyau de la cellule-hôte comme il l'a été démontré pour ROP16 (Saeij *et al.*, 2007), PP2C (Gilbert *et al.*, 2007), ROP47 (Camajo *et al.*, 2014) et GRA 16 (Bougdoor *et al.*, 2013). Certains de ces effecteurs parasitaires sécrétés sont impliqués dans la virulence comme ROP16 ou ROP18 par exemple.

La plupart des changements observés dans les cellules-hôtes infectées sont souches spécifiques et sont impliqués dans la différence de virulence observée chez *T. gondii* (Saeij *et al.*, 2005). C'est le cas par exemple pour le facteur de transcription STAT3 dont l'activation est observée avec les souches de type I et est déficiente dans le cas d'une infection avec une souche de type II (Butcher *et al.*, 2005). La régulation du facteur de transcription NF- κ B est également dépendante de la nature de la souche infectante de *T. gondii*. En effet, les souches de type II activent la voie NF- κ B et sa translocation bien plus que les souches de type I et III (Rosowski *et al.*, 2011). La nature de la régulation de la voie NF- κ B n'est par contre pas décrite pour les souches dites atypiques qui sont des souches complexes du point de vue de leur structure génomique. Il est cependant aussi décrit que le remodelage de la cellule-hôte par *T. gondii* peut se produire indépendamment du type de souche. Des effecteurs parasitaires dont la fonction est conservée entre les trois principaux types de parasite ont été identifiés ; c'est le cas par

exemple de la protéine parasitaire de granule dense GRA16, qui régule la voie p53 (Bougdour *et al.*, 2013). Ceci représentant une solution efficace pour contourner le système immunitaire (commun à de nombreux hôtes) et/ou assurer la survie parasitaire qui sont des besoins communs à toutes les souches de *T. gondii*.

Parmi les gènes modulés par le *T. gondii*, on retrouve des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et le cycle cellulaire est une des voies de signalisation de la cellule-hôte connue pour être modulée par le parasite (Brunet *et al.*, 2008, Molestina *et al.*, 2008). En effet, lors d'une infection par une souche de type I, l'infection induit un arrêt en phase G2 du cycle cellulaire des cellules infectées. Les bénéfices d'une telle régulation pour le parasite restent à déterminer. D'une part, ce blocage avant la phase mitotique pourrait permettre au parasite de maintenir le détournement des microtubules de l'hôte à son profit, décrit pour induire des invaginations de la membrane de la VP dans la lumière de la VP (structures HOST, Host Organelle Sequestrating Tubulo structures) ayant notamment un rôle dans la captation du cholestérol de l'hôte (Coppens *et al.*, 2006). D'autre part, *T. gondii* étant un parasite auxotrophe, cette limitation de la capacité de prolifération cellulaire de la cellule-hôte pourrait être une stratégie du parasite afin de s'assurer d'avoir suffisamment d'éléments nutritifs disponibles pour lui au lieu que ces mêmes nutriments ne soient utilisés par la cellule hôte en phase proliférative.

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié la régulation du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire lors de l'infection par des souches de virulence variable (type I, type II et atypique). Nous avons montré que, dans les cellules infectées par les souches de type I (RH) et II (Pru), le parasite induisait un arrêt de prolifération du cycle cellulaire en phase G2 corrélé à une diminution d'expression de la cycline B ayant

pour conséquence un arrêt de prolifération des cellules infectées. Des expériences menées avec la souche RH de type I par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont montré une augmentation de la liaison d'UHRF1 au promoteur du gène de la *cycline B*. Nous réaliserons cette même expérience avec la souche de type II afin d'étudier la cinétique de recrutement d'UHRF1 au promoteur du gène de la *cycline B*. Nous étudierons également l'expression protéique des autres protéines impliquées dans la régulation de la transition de la phase G2 à M, comme cdk1, p21 ou p53 par Western Blot. La souche atypique LEF quant à elle induit, un blocage des cellules en phase G2 pour des temps précoces d'infection corrélé à l'expression de la cycline B. Nous observons dans un deuxième temps, une reprise du cycle cellulaire, de l'expression de la cycline B. La souche LEF, isolée en 1994 d'une toxoplasmose congénitale chorioretinitogène, est génétiquement très proche de la souche TgCatBr5, isolée d'un chat brésilien et souche de référence de l'haplogroupe 8 du clade B. Le Brésil compte une prévalence particulièrement élevée de toxoplasmose oculaire, et les travaux de Grigg *et al.* (2001) indiquent une abondance de souches atypiques associées à ces formes de pathologies. La souche atypique LEF témoigne dans nos travaux d'un mécanisme d'échappement au blocage des cellules infectées en phase G2 du cycle cellulaire. Une des hypothèses pouvant être avancée pourrait être que, pour ces souches à potentiel fortement chorioretinitogène, le phénomène de latence n'a pas lieu, et la réplication des tachyzoïtes intense conduit à une destruction rapide des cellules rétinienne infectées. Dans des travaux portant sur la toxoplasmose oculaire en Amérique du Sud nous avons pu démontrer dans notre équipe que la charge parasitaire intra-oculaire s'avérait plus importante dans ces contextes cliniques (de la Torre *et al.*, 2013). Par ailleurs dans un modèle expérimental murin de

toxoplasmose congénitale oculaire, une infection toxoplasmique se soldait par une baisse du nombre des photorecepteurs suggérant une augmentation de l'apoptose de ces cellules non infectées (Lahmar *et al.*, 2014). Par conséquent nous analyserons l'apoptose dans le cas de cellules infectées par la souche LEF afin de vérifier comment cette souche isolée cliniquement régule les processus apoptotiques de la cellule hôte et aussi des cellules avoisinantes. En effet un effet by-stander par l'action d'exosomes issus de cellules infectées (Pope and Lässer, 2013) mérite notre attention dans un contexte intraoculaire. Pour cela, nous utiliserons la technique de cytométrie en flux et un marquage à l'Annexine V. Les travaux sur les micro-organismes intracellulaires altérant le cycle des cellules qu'ils infectent sont nombreux. Ce phénomène est particulièrement reconnu et utilisé par les virus : des modèles d'infection par les virus VIH-1, de l'hépatite B, ou du papillomavirus humain présentent des résultats similaires à nos travaux, avec un arrêt dans la progression du cycle cellulaire en phase G2/M associé à une meilleure réplication virale (He *et al.*, 1995 ; Nakahara *et al.*, 2002 ; Chin *et al.*, 2010). Parmi les protozoaires, plusieurs sont connus pour moduler le cycle cellulaire ; *Leishmania* spp. est connu pour induire un arrêt des cellules infectées en phase G0/G1 (Kuzmenok *et al.*, 2005). Les microsporidies du genre *Encephalitozoon* dérégulent le cycle cellulaire en de multiples points, les pourcentage de cellules en phase G1 et G2/M diminuant tandis que celui des cellules en phase S augmente (Scanlon *et al.*, 2000).

UHRF1 est impliqué dans la régulation de voies de signalisation clés de la cellule comme l'apoptose ou la prolifération cellulaire. De précédents travaux réalisés au laboratoire ont montré que *T.gondii* module l'expression d'UHRF1 pour réguler le cycle cellulaire. En

effet, UHRF1, en se fixant sur le promoteur du gène de la *cycline b*, induit une répression épigénétique de ce dernier conduisant à un arrêt du cycle cellulaire des cellules infectées en phase G2, à un arrêt de prolifération des cellules infectées et à la prolifération parasitaire. Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié la régulation de l'expression d'UHRF1 en fonction de la virulence des souches parasitaires. Nous avons montré que l'infection par *T. gondii* induisait une activation rapide du facteur de transcription-hôte UHRF1. D'autres facteurs de transcription comme STATs, NF-κB ou SRF sont connus pour être régulés par *T. gondii* (Yamamoto *et al.*, 2009, Rosowski *et al.*, 2011, Wiley *et al.*, 2011). L'activation d'UHRF1 est conservée entre les souches de type I, II et atypiques, suggérant que cette activation joue un rôle important dans la biologie intracellulaire du parasite. Comme décrit précédemment, *T. gondii* est capable de réguler les grandes voies de signalisation conservées chez toutes les cellules-hôtes ce qui lui confère une capacité à infecter toutes les cellules nucléées. Il n'est donc pas surprenant qu'UHRF1, un facteur de transcription très conservé (74 % d'homologie entre UHRF1 humain et son homologue murin) soit une cible de ce parasite. Il s'agit à notre connaissance du seul exemple de micro-organisme modulant l'expression de ce facteur de transcription. Des différences dans les cinétiques d'activation et d'expression d'UHRF1 ont néanmoins été observées. En effet, nous observons que les souches de type I (RH) et de type II (Pru) présentent un profil cinétique d'activation d'UHRF1 semblable, avec une activation transitoire du promoteur d'*uhrf1* et une expression protéique augmentée. Ces résultats obtenus avec les souches RH et Pru indiquent qu'en plus d'une activation transcriptionnelle d'UHRF1, le parasite régule également son expression au niveau post-transcriptionnelle. Notre hypothèse est que la protéine UHRF1

pourrait être stabilisée par l'infection toxoplasmique. La régulation de la demi-vie des protéines chez les mammifères peut faire intervenir des phosphorylations, acétylations ou des ubiquitinations. Pour valider l'hypothèse selon laquelle l'augmentation prolongée de la protéine UHRF1 pourrait être due à une augmentation de sa demi-vie, nous traiterons les cellules avec le cycloheximide, bloquant la synthèse des protéines, ou le MG132, inhibiteur du protéasome. La phosphorylation d'UHRF1 est décrite comme augmentant sa demi-vie. La phosphorylation d'UHRF1 lors de l'infection sera analysée par Western blot et par spectrométrie de masse. La souche atypique (LEF) présente quant à elle un profil singulier, avec une activation précoce, intense du promoteur d'*uhrf1*, mais une expression protéique transitoire quant à elle. L'absence d'augmentation de l'expression d'UHRF1 pour des temps longs pourrait être expliquée par l'absence de stabilisation de la protéine ou par une dégradation de celle-ci par le protéasome par exemple. Pour vérifier cette hypothèse, nous analyserons l'expression d'UHRF1 dans les cellules infectées par cette souche en présence d'un inhibiteur du protéasome mais également en analysant l'ubiquitination d'UHRF1 dans ce contexte. Nous avons observé une activation d'UHRF1 avec les trois souches étudiées avec des différences dans la cinétique d'activation ainsi que dans son intensité. Plusieurs effecteurs parasitaires pourraient être impliqués dans la régulation d'UHRF1 comme ROP16, qui module les STATs, GRA15 ou ROP18 impliqués dans la modulation de NF- κ B ou encore GRA24 qui active les MAPK (Yamamoto *et al.*, 2009, Rosowski *et al.*, 2011, Braun *et al.*, 2013, Du *et al.*, 2014). Et ceux d'autant plus que certains de ces facteurs parasitaires sont hautement polymorphiques et que leurs effets sur les voies de signalisation de la cellule-hôtes sont radicalement différents en fonction des souches (ROP16, ROP18, GRA15). Pour tester la

possibilité d'une induction en aval, par des effecteurs parasites du facteur de transcription UHRF1, nous pourrions utiliser des souches déficientes pour ROP16, ROP18, GRA15 ou GRA24 et analyser leur capacité à induire une activation d'UHRF1 par le système luciférase ou par western blot. Plus généralement, l'activation rapide d'UHRF1 dans les cellules-infectées pourrait suggérer qu'un facteur parasite sécrété précocement durant l'invasion serait impliqué. C'est pourquoi, le rôle des rhoptries et de leur sécrétion lors de l'infection par *T. gondii*, dans l'activation d'UHRF1 pourrait être analysé. En traitant les parasite avec de la cytochalasine D, qui bloque l'invasion parasite mais permet le relargage des rhoptries, l'activité du promoteur d'*uhrf1* pourrait être analysé par le système luciférase.

UHRF1 semble être un facteur de transcription majeur impliqué dans la prolifération parasite et caractériser les mécanismes responsables de cette activation a constitué la deuxième partie de ce travail. Parmi les facteurs de transcription ayant des sites de fixation sur le promoteur d'*uhrf1* et étant modulés par *T. gondii*, nous avons sélectionné le facteur de transcription NF- κ B. Son activité est modulée lors de l'infection et varie en fonction de la virulence des souches. L'activation de NF- κ B est initiée par la phosphorylation I κ B qui conduit à son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome permettant une translocation d'NF- κ B dans le noyau de la cellule. Dans les cellules BeWo, nous avons observé une phosphorylation d'I κ B dans les cellules infectées par les souches RH et Pru, alors que pour la souche LEF aucune variation d'expression d'I κ B phosphorylé n'a été observée. Ces résultats seront à confirmer par immunofluorescence

afin d'observer la cinétique de translocation de NF- κ B dans le noyau de la cellule-hôte infectée. Notre hypothèse est que, NF- κ B activé et transloqué dans le noyau des cellules infectées pourrait être impliqué dans l'activation d'UHRF1. La liaison de NF- κ B au promoteur d'*uhrf1* observée avec les souches RH et Pru, suggère une possible régulation d'UHRF1 NF- κ B-dépendante dans les cellules infectées. Ceci reste à confirmer avec la souche atypique LEF. Les sites de fixation de NF- κ B au promoteur d'*uhrf1* seront étudiés après transfection avec des mutants d'UHRF1 tronqués et analysés par immunoprécipitation de la chromatine. Nous avons observé de plus, qu'en l'absence d'activation de NF- κ B, une absence d'activation du promoteur du gène *uhrf1* ainsi qu'une absence d'augmentation de l'expression protéique d'UHRF1 dans les cellules infectées. Ceci suggère que l'expression d'UHRF1 est modulée par NF- κ B dans les cellules infectées par *T. gondii*. Ayant montré précédemment que NF- κ B était impliqué dans la régulation d'UHRF1 dans les cellules infectées, nous poursuivrons ce travail en analysant l'impact de NF- κ B dans la modulation UHRF1-dépendante de la régulation du cycle cellulaire des cellules infectées. Nous analyserons l'expression de la cycline B, le cycle cellulaire et la prolifération cellulaire en l'absence d'activation de NF- κ B.

En conclusion, dans ce travail, nous avons mis en évidence un nouveau mécanisme d'interaction entre *T. gondii* et son hôte impliquant un facteur de transcription clé dans la prolifération parasitaire, UHRF1. Nous avons montré que NF- κ B était impliqué dans l'activation d'UHRF1 dans les cellules infectées mais qu'également, un facteur parasitaire impliqué dans la virulence parasitaire pouvait être impliqué

directement ou indirectement (*via* d'autres voies de signalisation impactées par *T. gondii*). Plusieurs études ont investigué les corrélations possibles entre les types de souches et les manifestations cliniques chez l'Homme (Boothroyd *et al.*, 2002). Il est notamment décrit que seules les souches de type I et les atypiques conduisent à des affections oculaires sévères en Amérique du Nord (Grigg *et al.*, 2001 ; de la Torre *et al.*, 2013) ; les souches de type I sont également retrouvées en proportion très importante dans les toxoplasmoses congénitales sévères en Europe, ceci alors que les souches de type II circulent majoritairement (Howe *et al.*, 1997 ; Fuentes *et al.*, 2001). Déterminer le rôle précis de l'activation d'UHRF1 dans les cellules infectées ainsi que l'identification du ou des facteurs parasitaires responsables pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de persistances intracellulaire du parasite et ainsi de découvrir de nouveaux points d'impact thérapeutiques.

Pour conclure, dans la phase précoce, l'infection par la souche RH de type I et la souche Pru de type II induit une activation de NF- κ B initiée par la phosphorylation d'I κ B qui conduit à son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome permettant la translocation nucléaire de NF- κ B.

L'activation de NF- κ B dans les noyaux des cellules infectées conduit à l'activation d'UHRF1 qui possède 9 sites de liaison possibles de NF- κ B sur son promoteur. Ensuite, UHRF1 se fixe sur le promoteur du gène de la cycline B induisant une répression épigénétique de ce dernier et conduisant à un arrêt du cycle cellulaire des cellules infectées en phase G2 et un arrêt de la prolifération parasitaire.

Par contre, dans la phase tardive de l'infection, nous avons constaté une expression protéique augmentée ainsi qu'une activité transitoire sur le promoteur du gène *uhf1* qui pourrait être expliquée par la stabilisation protéique par l'infection toxoplasmique.

(Figure 19)

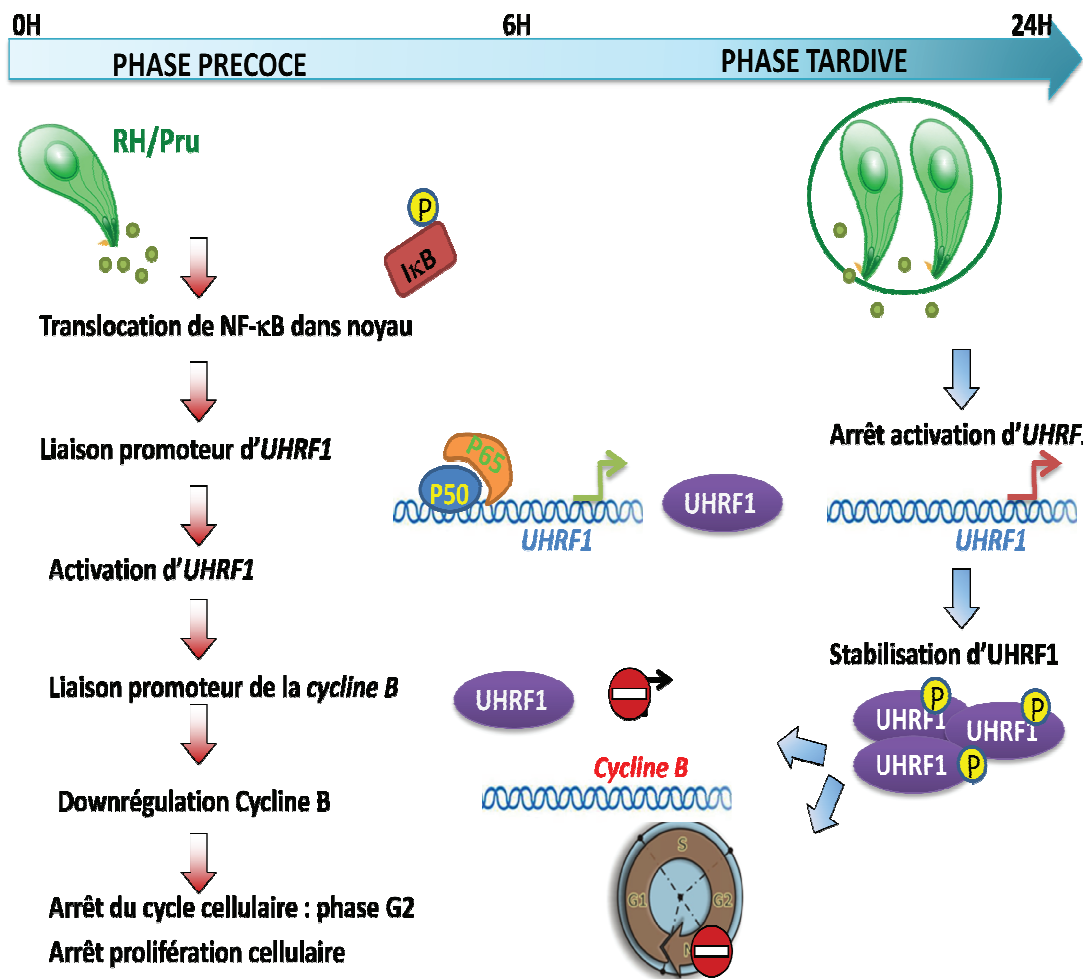


Figure 19 : Présentation schématique de la phase précoce et tardive dans les cellules infectées avec la souche RH et la souche Pru

De l'autre côté, l'infection par la souche atypique LEF dans le temps précoce de l'infection induit une activation de NF- κ B et une translocation nucléaire de ce dernier dans les noyaux des cellules hôtes infectées. La translocation nucléaire de NF- κ B induit donc l'activation d'UHRF1 qui va ensuite se fixer sur le promoteur du gène de la cycline B conduisant à un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G2 et à un arrêt de la prolifération cellulaire.

En revanche, dans la phase tardive de l'infection par la souche atypique LEF, nous avons constaté une expression transitoire d'UHRF1 et une activation continue sur son promoteur. En effet, l'absence d'augmentation de l'expression d'UHRF1 pour des temps longs pourrait être expliquée par l'absence de la stabilisation de la protéine ou par la dégradation de celle-ci par le protéasome.

La souche LEF témoigne d'un mécanisme d'échappement au blocage des cellules infectées en phase G2 du cycle cellulaire car cette souche a un potentiel fortement choriorétinogène et la réplication des tachyzoïtes intense conduit à une destruction rapide des cellules infectées. (*figure 20*)

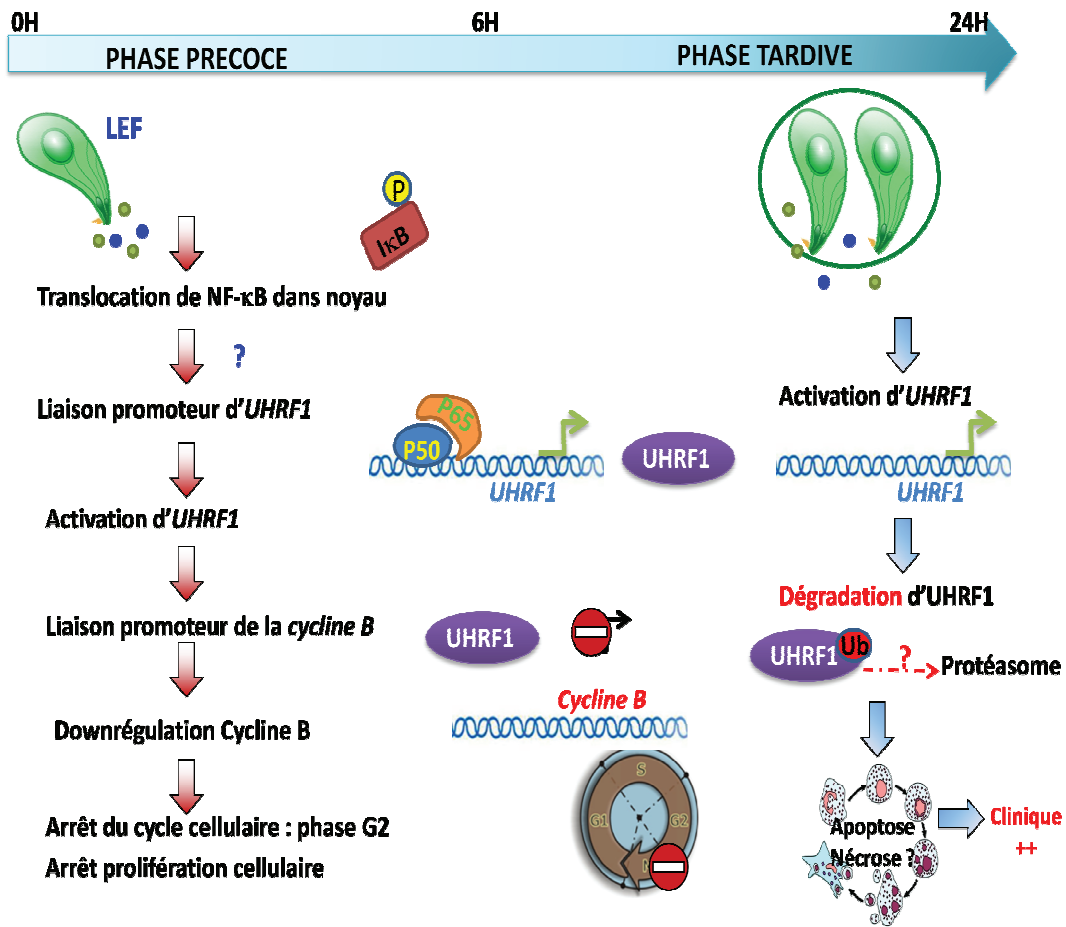


Figure 20 : Présentation schématique de la phase précoce et tardive dans les cellules infectées avec la souche atypique LEF

BIBLIOGRAPHIE

1. **Achour M, Jacq X, Ronde P, Alhosin M, Charlot C, Chataigneau T, Jeanblanc M, Macaluso M, Giordano A, Hughes AD, Schini-Kerth VB, Bronner C.** 2008. The interaction of the SRA domain of ICBP90 with a novel domain of DNMT1 is involved in the regulation of VEGF gene expression. *Oncogene* **27**:2187-2197.
2. **Achour M, Mousli M, Alhosin M, Ibrahim A, Peluso J, Muller CD, Schini-Kerth VB, Hamiche A, Dhe-Paganon S, Bronner C.** 2013. Epigallocatechin-3-gallate up-regulates tumor suppressor gene expression via a reactive oxygen species-dependent down-regulation of UHRF1. *Biochem Biophys Res Commun* **430**:208-212.
3. **AFSSA.** 2005. Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation. Maison ALFORT.
4. **Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP.** 2001. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert reviews in molecular medicine* **2001**:1-19.
5. **Ajzenberg D, Banuls AL, Su C, Dumetre A, Demar M, Carme B, Darde ML.** 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology* **34**:1185-1196.
6. **Ajzenberg D, Banuls AL, Tibayrenc M, Darde ML.** 2002. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *International journal for parasitology* **32**:27-38.

7. **Ajzenberg D, Cogne N, Paris L, Bessieres MH, Thulliez P, Filisetti D, Pelloux H, Marty P, Darde ML.** 2002. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* **186**:684-689.
8. **Ajzenberg D, Collinet F, Mercier A, Vignoles P, Dardé ML.**2010. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2010 Dec;**48(12):4641-5.**
9. **Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC.** 2005. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS pathogens* **1**:e17.
10. **Alhosin M, Abusnina A, Achour M, Sharif T, Muller C, Peluso J, Chataigneau T, Lugnier C, Schini-Kerth VB, Bronner C, Fuhrmann G.** 2010. Induction of apoptosis by thymoquinone in lymphoblastic leukemia Jurkat cells is mediated by a p73-dependent pathway which targets the epigenetic integrator UHRF1. *Biochem Pharmacol* **79**:1251-1260.
11. **Alhosin M, Sharif T, Mousli M, Etienne-Selloum N, Fuhrmann G, Schini-Kerth VB, Bronner C.** 2011. Down-regulation of UHRF1, associated with re-expression of tumor suppressor genes, is a common feature of natural compounds exhibiting anti-cancer properties. *J Exp Clin Cancer Res* **30**:41.
12. **Arima Y, Hirota T, Bronner C, Mousli M, Fujiwara T, Niwa S, Ishikawa H, Saya H.** 2004. Down-regulation of nuclear protein ICBP90 by p53/p21Cip1/WAF1-dependent DNA-damage checkpoint signals contributes to cell cycle arrest at G1/S transition. *Genes Cells* **9**:131-142.

13. Baeuerle PA¹, Henkel T. 1994. **Function and activation of NF-kappa B in the immune system.** Annual review of immunology
14. **Baum J, Papenfuss AT, Baum B, Speed TP, Cowman AF.** 2006. Regulation of apicomplexan actin-based motility. Nature reviews. Microbiology **4**:621-628.
15. **Beinke S, Robinson MJ, Hugunin M, Ley SC.** 2004. Lipopolysaccharide activation of the TPL-2/MEK/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade is regulated by IkappaB kinase-induced proteolysis of NF-kappaB1 p105. Molecular and cellular biology **24**:9658-9667.
16. **Ben-Neriah Y, Karin M.** 2011. Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. Nat Immunol **12**:715-723.
17. **Bhattacharyya S, Borthakur A, Dudeja PK, Tobacman JK.** 2010. Lipopolysaccharide-induced activation of NF-kappaB non-canonical pathway requires BCL10 serine 138 and NIK phosphorylations. Exp Cell Res **316**:3317-3327.
18. **Bhattacharyya S, Borthakur A, Tyagi S, Gill R, Chen ML, Dudeja PK, Tobacman JK.** 2010. B-cell CLL/lymphoma 10 (BCL10) is required for NF-kappaB production by both canonical and noncanonical pathways and for NF-kappaB-inducing kinase (NIK) phosphorylation. The Journal of biological chemistry **285**:522-530.
19. **Bonapace IM, Latella L, Papait R, Nicassio F, Sacco A, Muto M, Crescenzi M, Di Fiore PP.** 2002. Np95 is regulated by E1A during mitotic reactivation of

- terminally differentiated cells and is essential for S phase entry. *The Journal of cell biology* **157**:909-914.
20. **Bonizzi G, Bebien M, Otero DC, Johnson-Vroom KE, Cao Y, Vu D, Jegga AG, Aronow BJ, Ghosh G, Rickert RC, Karin M.** 2004. Activation of IKK α target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers. *EMBO J* **23**:4202-4210.
 21. **Boothroyd JC, Dubremetz JF.** 2008. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nature reviews. Microbiology* **6**:79-88.
 22. **Boothroyd JC, Grigg ME.** 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Current opinion in microbiology* **5**:438-442.
 23. **Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE.** 2007. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* **317**:1760-1764.
 24. **Bougdour A, Durandau E, Brenier-Pinchart MP, Ortet P, Barakat M, Kieffer S, Curt-Varesano A, Curt-Bertini RL, Bastien O, Coute Y, Pelloux H, Hakimi MA.** 2013. Host cell subversion by *Toxoplasma* GRA16, an exported dense granule protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression. *Cell host & microbe* **13**:489-500.
 25. **Boyer L, Travaglione S, Falzano L, Gauthier NC, Popoff MR, Lemichez E, Fiorentini C, Fabbri A.** 2004. Rac GTPase instructs nuclear factor-kappaB activation by conveying the SCF complex and I κ B α to the ruffling membranes. *Molecular biology of the cell* **15**:1124-1133.

26. **Bradley PJ, Ward C, Cheng SJ, Alexander DL, Coller S, Coombs GH, Dunn JD, Ferguson DJ, Sanderson SJ, Wastling JM, Boothroyd JC.** 2005. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of biological chemistry* **280**:34245-34258.
27. **Bronner C, Fuhrmann G, Chedin FL, Macaluso M, Dhe-Paganon S.** 2010. UHRF1 Links the Histone code and DNA Methylation to ensure Faithful Epigenetic Memory Inheritance. *Genet Epigenet* **2009**:29-36.
28. **Bronner C, Krifa M, Mousli M.** 2013. Increasing role of UHRF1 in the reading and inheritance of the epigenetic code as well as in tumorigenesis. *Biochem Pharmacol* **86**:1643-1649.
29. **Brunet J, Pfaff AW, Abidi A, Unoki M, Nakamura Y, Guinard M, Klein JP, Candolfi E, Mousli M.** 2008. *Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation. *Cellular microbiology* **10**:908-920.
30. **Butcher BA¹, Kim L, Johnson PF, Denkers EY.** 2001. *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. *the journal of immunology* **167**.4.2193
31. **Butcher BA, Denkers EY.** 2002. Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. *Infection and immunity* **70**:5216-5224.

32. **Butcher BA, Kim L, Panopoulos AD, Watowich SS, Murray PJ, Denkers EY.** 2005. IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. *Journal of immunology* **174**:3148-3152.
33. **Caamano J, Hunter CA.** 2002. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clinical microbiology reviews* **15**:414-429.
34. **Camejo A, Gold DA, Lu D, McFetridge K, Julien L, Yang N, Jensen KD, Saeij JP.** 2014. Identification of three novel *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins. *International journal for parasitology* **44**:147-160.
35. **Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M, Bichat S, Louvel D, Bourbigot AM, Peneau C, Neron P, Darde ML.** 2002. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *Journal of clinical microbiology* **40**:4037-4044.
36. **Chin R, Nachbur U, Earnest-Silveira L, Bankovacki A, Koeberlein B, Zentgraf H, Bock CT, Silke J, Torresi J.** 2010. Dysregulation of hepatocyte cell cycle and cell viability by hepatitis B virus. *Virus research* **147**:7-16.
37. **Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U.** 2002. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol* **3**:958-965.
38. **Coppens I, Dunn JD, Romano JD, Pypaert M, Zhang H, Boothroyd JC, Joiner KA.** 2006. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* **125**:261-274.

39. **Crnogorac-Jurcevic T, Gangeswaran R, Bhakta V, Capurso G, Lattimore S, Akada M, Sunamura M, Prime W, Campbell F, Brentnall TA, Costello E, Neoptolemos J, Lemoine NR.** 2005. Proteomic analysis of chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* **129**:1454-1463.
40. **Dejardin E.** 2006. The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol* **72**:1161-1179.
41. **De-la-Torre A, Sauer A, Pfaff AW, Bourcier T, Brunet J, Speeg-Schatz C, Ballonzoli L, Villard O, Ajzenberg D, Sundar N, Grigg ME, Gomez-Marin JE, Candolfi E.** 2013. Severe South American ocular toxoplasmosis is associated with decreased Ifn- γ /Il-17a and increased Il-6/Il-13 intraocular levels. *Plos neglected tropical diseases*. doi: 10.1371/journal.pntd.0002541
42. **Demar M, Hommel D, Djossou F, Peneau C, Boukhari R, Louvel D, Bourbigot AM, Nasser V, Ajzenberg D, Darde ML, Carme B.** 2012. Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **18**:E221-231.
43. **Denkers EY, Kim L, Butcher BA.** 2003. In the belly of the beast: subversion of macrophage proinflammatory signalling cascades during *Toxoplasma gondii* infection. *Cellular microbiology* **5**:75-83.
44. **Derouin F.** 2001. Anti-toxoplasmosis drugs. *Curr Opin Investig Drugs* **2**:1368-1374.

45. **Dobbelaere DA, Rottenberg S.** 2003. Theileria-induced leukocyte transformation. *Current opinion in microbiology* **6**:377-382.
46. **Dobbin CA, Smith NC, Johnson AM.** 2002. Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine toxoplasma infection via immunomodulation of host NF-kappa B and nitric oxide. *Journal of immunology* **169**:958-965.
47. **Du J, An R, Chen L, Shen Y, Chen Y, Cheng L, Jiang Z, Zhang A, Yu L, Chu D, Shen Y, Luo Q, Chen H, Wan L, Li M, Xu X, Shen J.** 2014. Toxoplasma gondii virulence factor ROP18 inhibits the host NF-kappaB pathway by promoting p65 degradation. *The Journal of biological chemistry* **289**:12578-12592.
48. **Dubey JP.** 2008. The history of Toxoplasma gondii--the first 100 years. *The Journal of eukaryotic microbiology* **55**:467-475.
49. **El Hajj H, Lebrun M, Arold ST, Vial H, Labesse G, Dubremetz JF.** 2007. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of Toxoplasma gondii. *PLoS pathogens* **3**:e14.
50. **Fentress SJ, Behnke MS, Dunay IR, Mashayekhi M, Rommereim LM, Fox BA, Bzik DJ, Taylor GA, Turk BE, Lichti CF, Townsend RR, Qiu W, Hui R, Beatty WL, Sibley LD.** 2010. Phosphorylation of immunity-related GTPases by a Toxoplasma gondii-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell host & microbe* **8**:484-495.
51. **Ferreiro DU, Komives EA.** 2010. Molecular mechanisms of system control of NF-kappaB signaling by IkappaBalpha. *Biochemistry* **49**:1560-1567.

52. **Fuentes I, Rubio JM, Ramirez C, Alvar J.** 2001. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *Journal of clinical microbiology* **39**:1566-1570.
53. **Gazzinelli RT, Brezin A, Li Q, Nussenblatt RB, Chan CC.** 1994. *Toxoplasma gondii*: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF-alpha and IFN-gamma. *Exp Parasitol* **78**:217-229.
54. **Gazzinelli RT, Sher A, Cheever A, Gerstberger S, Martin MA, Dickie P.** 1996. Infection of human immunodeficiency virus 1 transgenic mice with *Toxoplasma gondii* stimulates proviral transcription in macrophages in vivo. *The Journal of experimental medicine* **183**:1645-1655.
55. **Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G, Sher A.** 1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology* **153**:2533-2543.
56. **Ghosh D, Walton JL, Roepe PD, Sinai AP.** 2012. Autophagy is a cell death mechanism in *Toxoplasma gondii*. *Cellular microbiology* **14**:589-607.
57. **Ghosh S, Karin M.** 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109** Suppl:S81-96.
58. **Gilbert LA, Ravindran S, Turetzky JM, Boothroyd JC, Bradley PJ.** 2007. *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. *Eukaryotic cell* **6**:73-83.
59. **Gilmore TD, Gerondakis S.** 2011. The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease. *Genes Cancer* **2**:695-711.

60. **Gilmore TD, Wolenski FS.** 2012. NF-kappaB: where did it come from and why? *Immunological reviews* **246**:14-35.
61. **Gomez-Marin JE, de-la-Torre A, Barrios P, Cardona N, Alvarez C, Herrera C.** 2012. Toxoplasmosis in military personnel involved in jungle operations. *Acta tropica* **122**:46-51.
62. **Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP.** 2001. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis* **184**:633-639.
63. **Guizani-Tabbane L, Ben-Aissa K, Belghith M, Sassi A, Dellagi K.** 2004. *Leishmania major* amastigotes induce p50/c-Rel NF-kappa B transcription factor in human macrophages: involvement in cytokine synthesis. *Infection and immunity* **72**:2582-2589.
64. **Hacker H, Karin M.** 2006. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* **2006**:re13.
65. **Hayden MS, Ghosh S.** 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes & development* **18**:2195-2224.
66. **Hayden MS, Ghosh S.** 2008. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**:344-362.
67. **Hayden MS, Ghosh S.** 2012. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & development* **26**:203-234.
68. **Hervouet E, Lalier L, Debien E, Cheray M, Geairon A, Rogniaux H, Loussouarn D, Martin SA, Vallette FM, Cartron PF.** 2010. Disruption of

- Dnmt1/PCNA/UHRF1 interactions promotes tumorigenesis from human and mice glial cells. *PloS one* **5**:e11333.
69. **Heussler VT, Rottenberg S, Schwab R, Kuenzi P, Fernandez PC, McKellar S, Shiels B, Chen ZJ, Orth K, Wallach D, Dobbelaere DA.** 2002. Hijacking of host cell IKK signalosomes by the transforming parasite *Theileria*. *Science* **298**:1033-1036.
70. **Hoentjen F, Sartor RB, Ozaki M, Jobin C.** 2005. STAT3 regulates NF-kappaB recruitment to the IL-12p40 promoter in dendritic cells. *Blood* **105**:689-696.
71. **Honore S, Couvelard A, Garin YJ, Bedel C, Henin D, Darde ML, Derouin F.** 2000. [Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients]. *Pathologie-biologie* **48**:541-547.
72. **Hopfner R, Mousli M, Jeltsch JM, Voulgaris A, Lutz Y, Marin C, Bellocq JP, Oudet P, Bronner C.** 2000. ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase IIalpha expression. *Cancer research* **60**:121-128.
73. **Hopfner R, Mousli M, Oudet P, Bronner C.** 2002. Overexpression of ICBP90, a novel CCAAT-binding protein, overcomes cell contact inhibition by forcing topoisomerase II alpha expression. *Anticancer Res* **22**:3165-3170.
74. **Howe DK, Honore S, Derouin F, Sibley LD.** 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *Journal of clinical microbiology* **35**:1411-1414.
75. **Hunter CA, Remington JS.** 1994. Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. *J Infect Dis* **170**:1057-1067.

76. **Jeanblanc M, Mousli M, Hopfner R, Bathami K, Martinet N, Abbady AQ, Siffert JC, Mathieu E, Muller CD, Bronner C.** 2005. The retinoblastoma gene and its product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G1/S transition during the cell cycle. *Oncogene* **24**:7337-7345.
77. **Jensen KD, Hu K, Whitmarsh RJ, Hassan MA, Julien L, Lu D, Chen L, Hunter CA, Saeij JP.** 2013. Toxoplasma gondii rhoptry 16 kinase promotes host resistance to oral infection and intestinal inflammation only in the context of the dense granule protein GRA15. *Infection and immunity* **81**:2156-2167.
78. **Jin W, Chen L, Chen Y, Xu SG, Di GH, Yin WJ, Wu J, Shao ZM.** 2010. UHRF1 is associated with epigenetic silencing of BRCA1 in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **123**:359-373.
79. **Karagianni P, Amazit L, Qin J, Wong J.** 2008. ICBP90, a novel methyl K9 H3 binding protein linking protein ubiquitination with heterochromatin formation. *Molecular and cellular biology* **28**:705-717.
80. **Karin M.** 2005. Inflammation-activated protein kinases as targets for drug development. *Proc Am Thorac Soc* **2**:386-390; discussion 394-385.
81. **Karin M, Ben-Neriah Y.** 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annual review of immunology* **18**:621-663.
82. **Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW.** 2002. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* **2**:301-310.
83. **Karin M, Hunter T.** 1995. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* **5**:747-757.

84. **Kim JK, Esteve PO, Jacobsen SE, Pradhan S.** 2009. UHRF1 binds G9a and participates in p21 transcriptional regulation in mammalian cells. *Nucleic acids research* **37**:493-505.
85. **Kim L, Butcher BA, Denkers EY.** 2004. *Toxoplasma gondii* interferes with lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase activation by mechanisms distinct from endotoxin tolerance. *Journal of immunology* **172**:3003-3010.
86. **Kim YK, Jang YY, Kim DH, Ko HH, Han ES, Lee CS.** 2001. Differential regulation of protein tyrosine kinase on free radical production, granule enzyme release, and cytokine synthesis by activated murine peritoneal macrophages. *Biochem Pharmacol* **61**:87-96.
87. **Krifa M, Alhosin M, Muller CD, Gies JP, Chekir-Ghedira L, Ghedira K, Mely Y, Bronner C, Mousli M.** 2013. *Limoniastrum guyonianum* aqueous gall extract induces apoptosis in human cervical cancer cells involving p16 INK4A re-expression related to UHRF1 and DNMT1 down-regulation. *J Exp Clin Cancer Res* **32**:30.
88. **Kuzmenok OI, Chiang SC, Lin YC, Lee ST.** 2005. Retardation of cell cycle progression of macrophages from G1 to S phase by ICAM-L from *Leishmania*. *International journal for parasitology* **35**:1547-1555.
89. **Lahmar I, Pfaff AW, Marcellin L, Sauer A, Moussa A, Babba H, Candolfi E.** 2014. Müller cell activation and photoreceptor depletion in a mice model of congenital ocular toxoplasmosis. *Exp parasitol.* [exppara.2014.06.006](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.06.006).

90. **Lambert H, Hitziger N, Dellacasa I, Svensson M, Barragan A.** 2006. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cellular microbiology* **8**:1611-1623.
91. **Lambert H, Vutova PP, Adams WC, Lore K, Barragan A.** 2009. The *Toxoplasma gondii*-shuttling function of dendritic cells is linked to the parasite genotype. *Infection and immunity* **77**:1679-1688.
92. **Lawrence T, Bebien M, Liu GY, Nizet V, Karin M.** 2005. IKK α limits macrophage NF- κ B activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* **434**:1138-1143.
93. **Leng J, Butcher BA, Egan CE, Abi Abdallah DS, Denkers EY.** 2009. *Toxoplasma gondii* prevents chromatin remodeling initiated by TLR-triggered macrophage activation. *Journal of immunology* **182**:489-497.
94. **Liesenfeld O.** 1999. Immune responses to *Toxoplasma gondii* in the gut. *Immunobiology* **201**:229-239.
95. **Lim DC, Cooke BM, Doerig C, Saeij JP.** 2012. *Toxoplasma* and *Plasmodium* protein kinases: roles in invasion and host cell remodelling. *International journal for parasitology* **42**:21-32.
96. **Lorenzato M, Caudroy S, Bronner C, Evrard G, Simon M, Durlach A, Birembaut P, Clavel C.** 2005. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Hum Pathol* **36**:1101-1107.
97. **Ma H, Chen H, Guo X, Wang Z, Sowa ME, Zheng L, Hu S, Zeng P, Guo R, Diao J, Lan F, Harper JW, Shi YG, Xu Y, Shi Y.** 2012. M phase

- phosphorylation of the epigenetic regulator UHRF1 regulates its physical association with the deubiquitylase USP7 and stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**:4828-4833.
98. **Mason NJ, Artis D, Hunter CA.** 2004. New lessons from old pathogens: what parasitic infections have taught us about the role of nuclear factor-kappaB in the regulation of immunity. *Immunological reviews* **201**:48-56.
99. **Matzinger P.** 1998. An innate sense of danger. *Semin Immunol* **10**:399-415.
100. **Melo MB, Jensen KD, Saeij JP.** 2011. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends in parasitology* **27**:487-495.
101. **Mercier C, Dubremetz JF, Rauscher B, Lecordier L, Sibley LD, Cesbron-Delauw MF.** 2002. Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Molecular biology of the cell* **13**:2397-2409.
102. **Molestina RE, El-Guendy N, Sinai AP.** 2008. Infection with *Toxoplasma gondii* results in dysregulation of the host cell cycle. *Cellular microbiology* **10**:1153-1165.
103. **Molestina RE, Payne TM, Coppens I, Sinai AP.** 2003. Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated IkappaB to the parasitophorous vacuole membrane. *Journal of cell science* **116**:4359-4371.
104. **Molestina RE, Sinai AP.** 2005. Host and parasite-derived IKK activities direct distinct temporal phases of NF-kappaB activation and target gene expression following *Toxoplasma gondii* infection. *Journal of cell science* **118**:5785-5796.

105. **Montoya JG, Liesenfeld O.** 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* **363**:1965-1976.
106. **Mousli M, Hopfner R, Abbady AQ, Monte D, Jeanblanc M, Oudet P, Louis B, Bronner C.** 2003. ICBP90 belongs to a new family of proteins with an expression that is deregulated in cancer cells. *Br J Cancer* **89**:120-127.
107. **Nady N, Lemak A, Walker JR, Avvakumov GV, Kareta MS, Achour M, Xue S, Duan S, Allali-Hassani A, Zuo X, Wang YX, Bronner C, Chedin F, Arrowsmith CH, Dhe-Paganon S.** 2011. Recognition of multivalent histone states associated with heterochromatin by UHRF1 protein. *The Journal of biological chemistry* **286**:24300-24311.
108. **Nakahara T, Nishimura A, Tanaka M, Ueno T, Ishimoto A, Sakai H.** 2002. Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4. *Journal of virology* **76**:10914-10920.
109. **Nelson G, Wilde GJ, Spiller DG, Kennedy SM, Ray DW, Sullivan E, Unitt JF, White MR.** 2003. NF-kappaB signalling is inhibited by glucocorticoid receptor and STAT6 via distinct mechanisms. *Journal of cell science* **116**:2495-2503.
110. **Nemoto S, DiDonato JA, Lin A.** 1998. Coordinate regulation of I-kappaB kinases by mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 and NF-kappaB-inducing kinase. *Molecular and cellular biology* **18**:7336-7343.
111. **Oeckinghaus A, Ghosh S.** 2009. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**:a000034.

112. **Ohmori Y, Hamilton TA.** 2000. Interleukin-4/STAT6 represses STAT1 and NF-kappa B-dependent transcription through distinct mechanisms. *The Journal of biological chemistry* **275**:38095-38103.
113. **Ong YC, Reese ML, Boothroyd JC.** 2010. Toxoplasma rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. *The Journal of biological chemistry* **285**:28731-28740.
114. **Pasparakis M.** 2009. Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. *Nature reviews. Immunology* **9**:778-788.
115. **Payne TM, Molestina RE, Sinai AP.** 2003. Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappaB function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. *Journal of cell science* **116**:4345-4358.
116. **Perkins ND.** 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**:49-62.
117. **Perkins ND, Gilmore TD.** 2006. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell death and differentiation* **13**:759-772.
118. **Pfaff AW, de-la-Torre A, Rochet E, Brunet J, Sabou M, Sauer A, Bourcier T, Gomez-Marin JE, Candolfi E.** 2014. New clinical and experimental insights into Old World and neotropical ocular toxoplasmosis. *International journal for parasitology* **44**:99-107.
119. **Pfaff AW, Villard O, Klein JP, Mousli M, Candolfi E.** 2005. Regulation of *Toxoplasma gondii* multiplication in BeWo trophoblast cells: cross-regulation of nitric oxide production and polyamine biosynthesis. *International journal for parasitology* **35**:1569-1576.

120. **Pope SM, Lässer C.** 2013. *Toxoplasma gondii* infection of fibroblasts causes the production of exosome-like vesicles containing a unique array of mRNA and miRNA transcripts compared to serum starvation. *The journal of Extracellular Vesicles*.
121. **Razani B, Zarnegar B, Ytterberg AJ, Shiba T, Dempsey PW, Ware CF, Loo JA, Cheng G.** 2010. Negative feedback in noncanonical NF-kappaB signaling modulates NIK stability through IKKalpha-mediated phosphorylation. *Sci Signal* **3**:ra41.
122. **Reese ML, Boothroyd JC.** 2011. A conserved non-canonical motif in the pseudoactive site of the ROP5 pseudokinase domain mediates its effect on *Toxoplasma* virulence. *The Journal of biological chemistry* **286**:29366-29375.
123. **Robben PM, Mordue DG, Truscott SM, Takeda K, Akira S, Sibley LD.** 2004. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *Journal of immunology* **172**:3686-3694.
124. **Robert-Gangneux F, Darde ML.** 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical microbiology reviews* **25**:264-296.
125. **Rosowski EE, Lu D, Julien L, Rodda L, Gaiser RA, Jensen KD, Saeij JP.** 2011. Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *The Journal of experimental medicine* **208**:195-212.
126. **Rottach A, Frauer C, Pichler G, Bonapace IM, Spada F, Leonhardt H.** 2010. The multi-domain protein Np95 connects DNA methylation and histone modification. *Nucleic acids research* **38**:1796-1804.

127. **Sabatino L, Fucci A, Pancione M, Carafa V, Nebbioso A, Pistore C, Babbio F, Votino C, Laudanna C, Ceccarelli M, Altucci L, Bonapace IM, Colantuoni V.** 2012. UHRF1 coordinates peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARG) epigenetic silencing and mediates colorectal cancer progression. *Oncogene* **31**:5061-5072.
128. **Saeij JP, Boyle JP, Boothroyd JC.** 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends in parasitology* **21**:476-481.
129. **Saeij JP, Boyle JP, Coller S, Taylor S, Sibley LD, Brooke-Powell ET, Ajioka JW, Boothroyd JC.** 2006. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* **314**:1780-1783.
130. **Saeij JP, Coller S, Boyle JP, Jerome ME, White MW, Boothroyd JC.** 2007. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* **445**:324-327.
131. **Saito N, Courtois G, Chiba A, Yamamoto N, Nitta T, Hironaka N, Rowe M, Yamamoto N, Yamaoka S.** 2003. Two carboxyl-terminal activation regions of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activate NF-kappaB through distinct signaling pathways in fibroblast cell lines. *The Journal of biological chemistry* **278**:46565-46575.
132. **Scheidereit C.** 2006. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* **25**:6685-6705.
133. **Scrivo R, Vasile M, Bartosiewicz I, Valesini G.** 2011. Inflammation as "common soil" of the multifactorial diseases. *Autoimmunity reviews* **10**:369-374.

134. **Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M.** 2001. Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* **293**:1495-1499.
135. **Serhan CN, Savill J.** 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* **6**:1191-1197.
136. **Servent M.J., Clement JF, Meloche S.** 2010. The IKK-related kinase, unsuspected culprits in oncogenesis ? *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* **14**:217.
137. **Shapira S, Harb OS, Caamano J, Hunter CA.** 2004. The NF-kappaB signaling pathway: immune evasion and immunoregulation during toxoplasmosis. *International journal for parasitology* **34**:393-400.
138. **Shapira S, Harb OS, Margarit J, Matrajt M, Han J, Hoffmann A, Freedman B, May MJ, Roos DS, Hunter CA.** 2005. Initiation and termination of NF-kappaB signaling by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Journal of cell science* **118**:3501-3508.
139. **Shapira S, Speirs K, Gerstein A, Caamano J, Hunter CA.** 2002. Suppression of NF-kappaB activation by infection with *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis* **185 Suppl 1**:S66-72.
140. **Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K, Tajima S, Mitsuya K, Okano M, Koseki H.** 2007. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* **450**:908-912.

141. **Shastri AJ, Marino ND, Franco M, Lodoen MB, Boothroyd JC.** 2014. GRA25 is a novel virulence factor of *Toxoplasma gondii* and influences the host immune response. *Journal of Infection and Immunity*.
142. **Sheiner L, Santos JM, Klages N, Parussini F, Jemmely N, Friedrich N, Ward GE, Soldati-Favre D.** 2010. *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. *Molecular Microbiology*.
143. **Sibley LD.** 2003. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic* **4**:581-586.
144. **Sibley LD, Boothroyd JC.** 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* **359**:82-85.
145. **Sinai AP, Joiner KA.** 2001. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *The Journal of Cell Biology* **154**:95-108.
146. **Sinai AP, Payne TM, Carmen JC, Hardi L, Watson SJ, Molestina RE.** 2004. Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* **34**:381-391.
147. **Spear W, Chan D, Coppens I, Johnson RS, Giaccia A, Blader IJ.** 2006. The host cell transcription factor hypoxia-inducible factor 1 is required for *Toxoplasma gondii* growth and survival at physiological oxygen levels. *Cellular Microbiology* **8**:339-352.
148. **Steinfeldt T, Konen-Waisman S, Tong L, Pawlowski N, Lamkemeyer T, Sibley LD, Hunn JP, Howard JC.** 2010. Phosphorylation of mouse immunity-

- related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS Biol* **8**:e1000576.
149. **Su C, Howe DK, Dubey JP, Ajioka JW, Sibley LD.** 2002. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:10753-10758.
 150. **Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Darde ML, Zhu XQ, Ajioka JW, Rosenthal BM, Dubey JP, Sibley LD.** 2012. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**:5844-5849.
 151. **Sun SC.** 2008. Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Nature reviews. Immunology* **8**:501-511.
 152. **Sun SC, Ley SC.** 2008. New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends Immunol* **29**:469-478.
 153. **Sundar N, Cole RA, Thomas NJ, Majumdar D, Dubey JP, Su C.** 2008. Genetic diversity among sea otter isolates of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary parasitology* **151**:125-132.
 154. **Tas SW, Vervoordeldonk MJ, Hajji N, Schuitemaker JH, van der Sluijs KF, May MJ, Ghosh S, Kapsenberg ML, Tak PP, de Jong EC.** 2007. Noncanonical NF-kappaB signaling in dendritic cells is required for indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induction and immune regulation. *Blood* **110**:1540-1549.

155. **Tato CM, Hunter CA.** 2002. Host-pathogen interactions: subversion and utilization of the NF-kappa B pathway during infection. *Infection and immunity* **70**:3311-3317.
156. **Tato CM, Villarino A, Caamano JH, Boothby M, Hunter CA.** 2003. Inhibition of NF-kappa B activity in T and NK cells results in defective effector cell expansion and production of IFN-gamma required for resistance to *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology* **170**:3139-3146.
157. **Taylor GA.** 2007. IRG proteins: key mediators of interferon-regulated host resistance to intracellular pathogens. *Cellular microbiology* **9**:1099-1107.
158. **Taylor S, Barragan A, Su C, Fux B, Fentress SJ, Tang K, Beatty WL, Hajj HE, Jerome M, Behnke MS, White M, Wootton JC, Sibley LD.** 2006. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* **314**:1776-1780.
159. **Tenter AM, Heckerroth AR, Weiss LM.** 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International journal for parasitology* **30**:1217-1258.
160. **Tien AL, Senbanerjee S, Kulkarni A, Mudbhary R, Goudreau B, Ganesan S, Sadler KC, Ukomadu C.** 2011. UHRF1 depletion causes a G2/M arrest, activation of DNA damage response and apoptosis. *Biochem J* **435**:175-185.
161. **Unoki M, Kelly JD, Neal DE, Ponder BA, Nakamura Y, Hamamoto R.** 2009. UHRF1 is a novel molecular marker for diagnosis and the prognosis of bladder cancer. *Br J Cancer* **101**:98-105.

162. **Unoki M, Nishidate T, Nakamura Y.** 2004. ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain. *Oncogene* **23**:7601-7610.
163. **Vitiello M, Finamore E, Falanga A, Raieta K, Cantisani M, Galdiero F, Pedone C, Galdiero M, Galdiero S.** 2010. Viral fusion peptides induce several signal transduction pathway activations that are essential for interleukin-10 and beta-interferon production. *Intervirology* **53**:381-389.
164. **Vitiello M, Galdiero M, Finamore E, Galdiero S, Galdiero M.** 2012. NF-kappaB as a potential therapeutic target in microbial diseases. *Mol Biosyst* **8**:1108-1120.
165. **Wang F, Yang YZ, Shi CZ, Zhang P, Moyer MP, Zhang HZ, Zou Y, Qin HL.** 2012. UHRF1 promotes cell growth and metastasis through repression of p16(ink(4)a) in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* **19**:2753-2762.
166. **Whiteside ST, Israel A.** 1997. I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol* **8**:75-82.
167. **Wiley M, Teygong C, Phelps E, Radke J, Blader IJ.** 2011. Serum response factor regulates immediate early host gene expression in *Toxoplasma gondii*-infected host cells. *PloS one* **6**:e18335.
168. **Xiao W.** 2004. Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. *Cellular & molecular immunology* **1**:425-435.
169. **Yamamoto M, Standley DM, Takashima S, Saiga H, Okuyama M, Kayama H, Kubo E, Ito H, Takaura M, Matsuda T, Soldati-Favre D, Takeda K.** 2009. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16

- determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *The Journal of experimental medicine* **206**:2747-2760.
170. **Yang N, Farrell A, Niedelman W, Melo M, Lu D, Julien L, Marth GT, Gubbels MJ, Saeij JP.** 2013. Genetic basis for phenotypic differences between different *Toxoplasma gondii* type I strains. *BMC genomics* **14**:467.
171. **Zhang X, Yuan Z, Duan Q, Zhu H, Yu H, Wang Q.** 2009. Mucosal immunity in mice induced by orally administered transgenic rice. *Vaccine* **27**:1596-1600.
172. **Zimmermann S, Murray PJ, Heeg K, Dalpke AH.** 2006. Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling. *Journal of immunology* **176**:1840-1847.
173. **Rapport Annuel d'activités Du Centre National de Référence de la Toxoplasmose.** 2014. Année d'exercice. 2013.

Influence de *Toxoplasma gondii* dans la régulation d'UHRF1 *via* la voie NF- κ B

Résumé

T. gondii interfère avec l'activation des voies de signalisation de NF- κ B des cellules hôtes. Ainsi, lors de l'infection par *T. gondii*, 85% des gènes dépendant de NF- κ B sont up-régulés. Un autre facteur de transcription dont l'expression est modulée par le parasite est UHRF1 (Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1). UHRF1, en se fixant sur le promoteur du gène de la *cycline b*, induit une répression épigénétique de ce dernier conduisant à un arrêt du cycle cellulaire des cellules infectées en phase G2 et à un arrêt de la prolifération parasitaire. L'analyse *in silico* du promoteur du gène *uhrf1* a montré qu'il possédait 9 sites de fixation de NF- κ B. Effectivement nous avons démontré que NF- κ B interagit avec le promoteur du gène *uhrf1* lors d'une infection par *T. gondii*. L'expression d'UHRF1 serait donc modulée par NF- κ B dans les cellules infectées par *T. gondii*. Or NF- κ B a une régulation différentielle en fonction de la nature de la souche infectante. Là encore, nous avons pu observer une régulation différentielle d'UHRF1 selon la nature de la souche infectante, pouvant être dues à la régulation souche dépendante de NF- κ B. La détermination du rôle précis de l'activation d'UHRF1 dans les cellules infectées et l'identification du ou des facteurs parasitaires responsables pourraient permettre de mieux comprendre les mécanismes de persistance intracellulaire du parasite et de découvrir de nouveaux points d'impact thérapeutiques.

Mots-clé : *Toxoplasma gondii*, cycle cellulaire, UHRF1, cycline B, NF- κ B, virulence, Immunoprécipitation de la chromatine.

Abstract

T. gondii interferes with the activation of NF- κ B signaling pathways. Thus, upon infection by *T. gondii*, 85% of genes NF- κ B-dependent are up-regulated. Another transcription factor whose expression is modulated by the parasite is UHRF1 (Ubiquitin-like, Containing PHD and RING finger domains, 1). UHRF1, bind to the gene promoter of *cyclin b* and induces epigenetic repression of this gene leading to cell cycle arrest in G2 phase of infected cells and stop the proliferation in both infected cells and parasite. *In silico* analysis of the *uhrf1* gene promoter has been shown to possess 9 binding sites of NF- κ B. Our study showed that NF- κ B actually interacts with the promoter of gene *uhrf1* during infection with *T. gondii*. This suggests that the expression of UHRF1 is modulated by NF- κ B in *T. gondii*-infected cells. In addition we observed differential regulation of UHRF1 depending on the nature of the infecting strain. These variations may also be due to already well-known differential regulation of NF- κ B by different strains of *T. gondii*. Determining the precise role of UHRF1 activation in infected cells and the identification of the parasitic factor responsible of this activation would allow to a better understanding of the mechanisms of intracellular persistence of the parasite and allow to unravel new therapeutic trails.

Key words: *Toxoplasma gondii*, cell cycle, UHRF1, cyclin B, NF- κ B, virulence, Chromatine Immunoprecipitation.