



HAL
open science

Etude de l'interférence d'une épi-drogue sur l'expression génique et la croissance intracellulaire de *Toxoplasma gondii*

Hélène Marche

► **To cite this version:**

Hélène Marche. Etude de l'interférence d'une épi-drogue sur l'expression génique et la croissance intracellulaire de *Toxoplasma gondii*. Immunologie. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAV019 . tel-02372167

HAL Id: tel-02372167

<https://theses.hal.science/tel-02372167v1>

Submitted on 20 Nov 2019

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : Virologie - Microbiologie - Immunologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Hélène Marche

Thèse dirigé par **Mohamed-Ali HAKIMI, DR1, INSERM Institute
for Advanced Biosciences IAB, Grenoble**

Préparée au sein du **Laboratoire Host-Pathogens interactions
& Immunity to Infections.**

Dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du vivant.**

**Etude de l'interférence d'une épi-drogue sur
l'expression génique et la croissance intracellulaire
de *Toxoplasma gondii*.**

**Study of the interference of an epi-drug on the gene
expression and intracellular growth of *Toxoplasma
gondii*.**

Thèse soutenue publiquement le, **16 juillet 2019**,
devant le jury composé de :

Madame Geneviève Milon

Directeur de Recherche Emérite, Institut Pasteur, Rapporteur

Monsieur Gordon Langsley

Directeur de Recherche 1, Institut Cochin, Rapporteur

Madame Isabelle Tardieux

Directeur de Recherche 1, Institut pour l'avancé des biosciences, Examineur

Monsieur Patrice Morand

Professeur des universités - praticien hospitalier, Institut de Biologie et de
Pathologie, Président du jury



Remerciement

Tout d'abord je tiens à remercier les membres du jury : Dr Isabelle Tardieux, Dr Geneviève Milon, Dr Gordon Langsley et Pr Patrice Morand, pour avoir accepté de lire ce manuscrit et de porter un œil critique sur mes travaux de thèse. Merci plus particulièrement à Geneviève Milon et Gordon Langsley pour leur rôle de rapporteur. Sans oublier l'honneur que me fait Patrice Morand d'accepter le rôle de Président de jury.

Je remercie mon directeur de thèse Mohamed-Ali Hakimi, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, et aussi tous les membres de son équipe encore présent ou ancien membre, sans oublier l'équipe d'Isabelle Tardieux, et particulièrement pour les personnes avec qui j'ai collaboré, ainsi qu'à mon voisin de bureau Andres, qui a été d'une compagnie calme et agréable.

Je tiens à remercier toutes les personnes scientifiques, qui m'ont apporté leur aide durant ces trois années, que ce soit par des conseils ou discussions scientifique dans différents domaines et m'ont permis d'aiguiser mes compétences.

C'est également l'occasion de remercier toutes les personnes qui m'ont encadré ou avec qui j'ai collaboré, avant la thèse, elles ont participé à mon parcours scientifique.

Je souhaite également remercier mes amis Steffy, Virginie, Mathieu, Franck, Agnès, Thomas, Lucas, Alexia, Julien, Chloé, Gregory, Sophie, Aurélie, Séverine et Fabien qui ont toujours été présent quand j'en ressentais le besoin. Ils ont réussi à adoucir ces trois années avec des moments de joie, de rire.

Aussi un petit mot pour mon coach d'équitation Denys Troussier, un modèle de patiente, de persévérance, une personne humble. Il m'a appris à prendre le temps si on veut atteindre le sommet et à aller au-delà de ses capacités. Et à toute son équipe Sophie, Marline et Margot, qui m'ont permis d'allier ma passion et mon métier. Aussi à toutes les personnes des écuries, de leur compagnie qui permet durant un instant de lâcher prise et d'oublier les soucis.

A Valérie, qui m'a permis d'apprendre à mieux à me connaître, et m'a donné pleins d'outils nécessaire pour m'améliorer et réussir, des outils qui me serviront tout au long de ma vie.

Une pensée à Pierre Hainaut, un grand merci pour sa confiance qu'il a en moi. Mais surtout pour ses conseils avisés et chaleureux, de son aide et son soutien. D'avoir toujours pris le temps pour m'écouter.

Il est important que je remercie tous mes proches, ma famille. A mes parents qui ont toujours été là pour me soutenir, m'encourager et m'aider. Ils m'ont apporté sagesse, conseil et détermination, sans eux je ne serais pas là où je suis que ce soit sur un plan personnel et scientifique. Mais le plus important, ils ont cru en moi. Ils sont restés une aide discrète mais présente dans les moments difficiles.

Un grand merci à mon compagnon Jeroen, qui a su m'encourager, me soutenir mais le plus important de croire en moi, en mes idées et mes capacités. Il m'a donné énergie et source de motivation et d'inspiration. Il a été présent et m'a apporté beaucoup de son aide à tous les moments de cette aventure. Merci pour tous les conseils et discussions scientifiques que nous avons pu échanger, grâce à lui j'ai affuté certains sens critiques, de la persévérance et de l'assurance. Sans lui j'aurais été perdue, il a su être le guide dont j'avais besoin.

Un mot à Yves et Alix, parties bien trop vite, avec qui j'aurais aimé partager ce moment.

Je suis impatiente de commencer le postdoc que j'ai obtenu en Californie. Une nouvelle aventure s'offre à moi, remplie et riche de découverte scientifique et humaine. Surtout je suis ravie de vivre cette aventure avec Jeroen.

***La seule et unique obligation de l'Homme est d'accomplir sa quête personnelle.
Paulo Coelho, L'alchimiste***

Table des matières

I.	Introduction.....	5
A.	<i>Toxoplasma gondii</i> et Toxoplasmose.....	6
B.	Cycle de vie	7
1.	Tachyzoïtes	8
2.	Kystes/ Bradyzoïtes	9
3.	Oocystes/sporozoïtes	9
4.	Phase asexuée /sexué	9
C.	Génome de <i>Toxoplasma gondii</i>	10
D.	Différentes souches.....	10
1.	Souches de Génotype I.....	11
2.	Souches de Génotype II	11
3.	Souches de Génotype III.....	12
4.	Souches recombinantes et atypiques	12
E.	Organisation du parasite	13
1.	Micronèmes :	14
2.	Rhoptries :	14
3.	Dense granules :	14
F.	Gene expression et régulation (régulation de l'expression génique)	15
G.	Les familles Histone acétylase et histone désacétylase de <i>T. gondii</i>	17
H.	Réaction immunitaire de l'hôte.....	18
1.	Réponse immunitaire innée.....	19
2.	Réponse immunitaire adaptative	20
II.	Objet d'étude.....	22
III.	Résultats.....	25
A.	Composé I2	26
1.	Résultat préliminaire HMS-I2 par l'équipe du Pr. Robin C. Allshire	26
2.	Résultats préliminaires : transcriptomique.....	27
3.	Le composé I2 inhibe la croissance chez <i>T. gondii</i> de manière souche indépendante.....	29
4.	Phénotype vacuole souche dépendant	31
5.	I2 n'induit pas l'expression de ENO1.....	36
6.	Caractéristique de la taille de la vacuole.....	37
7.	Etude de l'impact de I2 sur les protéines des denses granules.....	39

8. Etude de génétique inverse pour identifier le locus responsable dans le phénotype « bubble » médié par I2	46
9. Etude des gènes.....	49
B. Etude du gène TG-229480	53
1. Résultats préliminaires	53
2. Génération d'une souche épitope tagué et délété pour le gène TG-229480	54
1. Imagerie et localisation de la protéine.....	54
2. Plage de lyse et défaut de croissance	56
3. Défaut de croissance, teste de compétition.....	57
4. Plage de lyse et traitement à l'INF γ	60
5. Immunoprécipitation TAB/TAK	62
IV. Discussion & perspective	63
V. Matériel & Méthode.....	71
A. Culture cellulaire et parasites	72
B. Anticorps et réactifs	72
C. Traitement avec la drogue I2	73
D. Plasmide construction P-Lic et CrisprCas9.....	73
1. LIC	73
2. CRISPR/Cas9	74
E. Transfections	74
F. Immunofluorescence	74
G. QTL mapping (quantitative trait loci)	75
H. Extraction protéique de la cellule hôte.....	75
I. Co-immuno précipitation des protéines du complexe Flag-tagué.....	75
J. Analyse Immunoblotting (Western blot).....	75
K. Plages de lyses et traitement à l'IFN γ	76
L. Test de compétition	76
M. Analyse statistique.....	76
VI. Bibliographie	77

Listes des abréviations :

ADN	Acide DéoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	cluster de différenciation
DC	Cellule dendritque
DHFR	Dihydrofolate Réductase
DL	Dose léthale
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetate
GRA	Protéines des denses granules
HAT	histone acétylase
HDAC	histone désacétylase
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine.
HFF	Human Foreskin Fibroblasts
IMC	Inner Membrane Complex
IL	interleukine
IFN γ	Interferon gamma
MICs	Micronème protéines
MEF	Mouse fibroblasts
NO	oxyde nitrique
KO	Knock-out
PAGE	Poly Acrylamide Gel Electrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PV	Parasitophorus vacuole
PVM	membrane de la vacuole parasitophorus
QTL	quantification trait loci
RFLP	restriction Fragments Lenght Polymorphism
ROP	Protéines de rhoptries
SNP	Single nucleotide polymorphisme
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIDA	Syndrôme d'immuno-Déficience Acquise
TNF α	Tumor Necrosis factor alpha
VIH	Virus de l'immunodéficience humain
WT	Wylid type
YFP	Yellow fluoresceine proteine

I. Introduction

A. *Toxoplasma gondii* et Toxoplasmose

Le phylum des Apicomplexes constitue un groupe ancien et diversifié de protistes parasites (plus de 5000 espèces). Certains Apicomplexes sont des agents d'infections humaines et vétérinaires majeures telles que le paludisme (*Plasmodium* sp.), la toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*), la coccidiose des ovins et des gallinacés (*Eimeria* sp.) ou la cryptosporidiose (*Cryptosporidium*). Les *Apicomplexa* sont des parasites intracellulaires obligatoires, qui infectent une grande variété d'hôtes allant des invertébrés aux mammifères. *Toxoplasma gondii* est un des parasites le plus performant de par sa distribution répandue dans le monde, mais aussi par sa capacité à infecter toutes cellules nucléées de tous les animaux à sang chaud (Dubey., 2009). *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) est l'agent causal de la Toxoplasmose. En France, l'incidence de la toxoplasmose est près de 60% de la population et au Brésil, environ 80% de la population a contracté la toxoplasmose (Dubey et al, 2012). Chez l'adulte immunocompétent, l'infection par *T. gondii* est asymptomatique et le plus souvent bénigne. Cependant, elle s'avère plus dangereuse chez des personnes immunodéprimées tels que les patients atteints du SIDA, les greffés, et elle peut provoquer des avortements spontanés lors d'une primo-infection chez la femme enceinte ou atteindre le fœtus avec de grave problème concernant son développement, et dans ce cas on parle de Toxoplasmose congénitale. La toxoplasmose aiguë entraîne une infection chronique caractérisée par la présence de kystes toxoplasmiques dans les cellules musculaires et cérébrales (Dubey et al, 1998). La réactivation de kystes présents dans le tissu rétinien est une principale cause de cécité (Furtad et al, 2011). Plusieurs études ont montré une association entre l'infection chronique et des troubles psychiatriques (Tyebji et al, 2019). *T. gondii* est répertorié comme un agent de classe B de préoccupation pour la bio-défense (<http://www.niaid.nih.gov/topics/biodefense>). Concernant l'infection de *T. gondii* dans le monde animal, il est connu que l'infection a une incidence vétérinaire non négligeable car elle est une des causes d'avortement dans les élevages qui conduit à une perte économique significative. Malgré de nombreuses recherches, aucun vaccin chez l'homme contre *T. gondii* et aucune thérapie ne permet à ce jour d'éliminer le réservoir de kystes cérébraux pour prévenir la réactivation et les maladies associées. Il existe un vaccin pour les petits ruminants, mais ce vaccin vivant atténué présente des risques de réversion et par conséquent n'est pas adapté à l'homme. Le fait que *T. gondii* infecte et se multiplie dans les cellules d'origine humaine et animale, rend ce modèle pertinent pour étudier les interactions hôte-pathogène que ce soit au niveau moléculaire, cellulaire et au niveau des processus biologiques contrôlant l'infection dans les deux espèces. *T. gondii* est un parasite protozoaire intracellulaire obligatoire découvert, en 1908, par Charles Nicolle et Louis Manceaux à l'Institut Pasteur de Tunis chez un rongeur « *ctenodactylus gundi* » (Nicolle et Manceaux 1908,

Nicolle et Manceaux, 1909). De manière indépendante, ce parasite a été découvert chez le lapin au Brésil par Alphonso Splendore (Splendore, 1908). *T. gondii* tire son nom du grec *toxos*= arc et *plasma*=forme, pour la morphologie du parasite et *gondii* de l'espèce du rongeur dans lequel il a été isolé. Depuis ce parasite a été retrouvé dans plusieurs hôtes différents avec une répartition mondiale. Paradoxalement, en dépit de sa large répartition mondiale et l'éventail de ses hôtes, il n'est admis qu'une seule espèce dans le genre : *Toxoplasma gondii*. *T. gondii* est l'agent responsable de la Toxoplasmose, les premiers cas de cette pathologie ont été décrits entre 1920 et 1930. C'est en 1939 que le premier diagnostic chez l'Homme a été effectué (Wolf *et al*, 1939). L'identification de la viande imparfaitement cuite responsable de l'infection humaine a été mise en avant dans les années 1960 (Desmont et Couvreur, 1965). Finalement, c'est en 1969 que le chat comme hôte définitif du parasite a été découvert, et cette découverte a permis de comprendre le cycle d'infection du parasite (Hutchison, 1965 ; Frenkel *et al*, 1969). Il est à retenir que les félidés jouent un rôle important dans la transmission du parasite de l'animal à l'homme puisqu'ils sont les seuls animaux à excréter le toxoplasme et à permettre la reproduction sexuée de *T. gondii*.

B. Cycle de vie

Le cycle de *T. gondii* est complexe et comprend deux types d'hôtes : les hôtes définitifs et intermédiaires ainsi que deux formes de multiplication : asexuée et sexuée, cette dernière se retrouvant exclusivement chez l'hôte définitif. Les hôtes définitifs font parties de la famille des félidés, le chat est sûrement l'espèce la plus représentative. Le cycle inclut aussi différents stades parasitaires, les tachyzoïtes, les kystes contenant les bradyzoïtes et les oocystes sporulés contenant les sporozoïtes. Le cycle complet du parasite a été décrit et découvert par Hutchison (Hutchison, 1965) ainsi que par Frenkel et Dubey (Frenkel *et al*, 1969). Brièvement, dans l'intestin de l'hôte définitif, par exemple le chat, se produit la phase asexuée avec comme conséquence finale le relargage d'oocystes par millions dans les fèces du chat. Ces oocystes vont être ingérés de manière fortuite par l'hôte intermédiaire, puis vont avoir une conversion vers le stade tachyzoïte, forme très invasive du parasite. A ce stade, a lieu une dissémination du parasite au cours de laquelle, le parasite forme des kystes contenant des bradyzoïtes, forme latente, dans certains types cellulaires bien précis.

Enfin, lorsque le chat ingère la viande d'un hôte intermédiaire infecté possédant des kystes, ceux-ci vont se rompre et un nouveau cycle commence (Figure1).

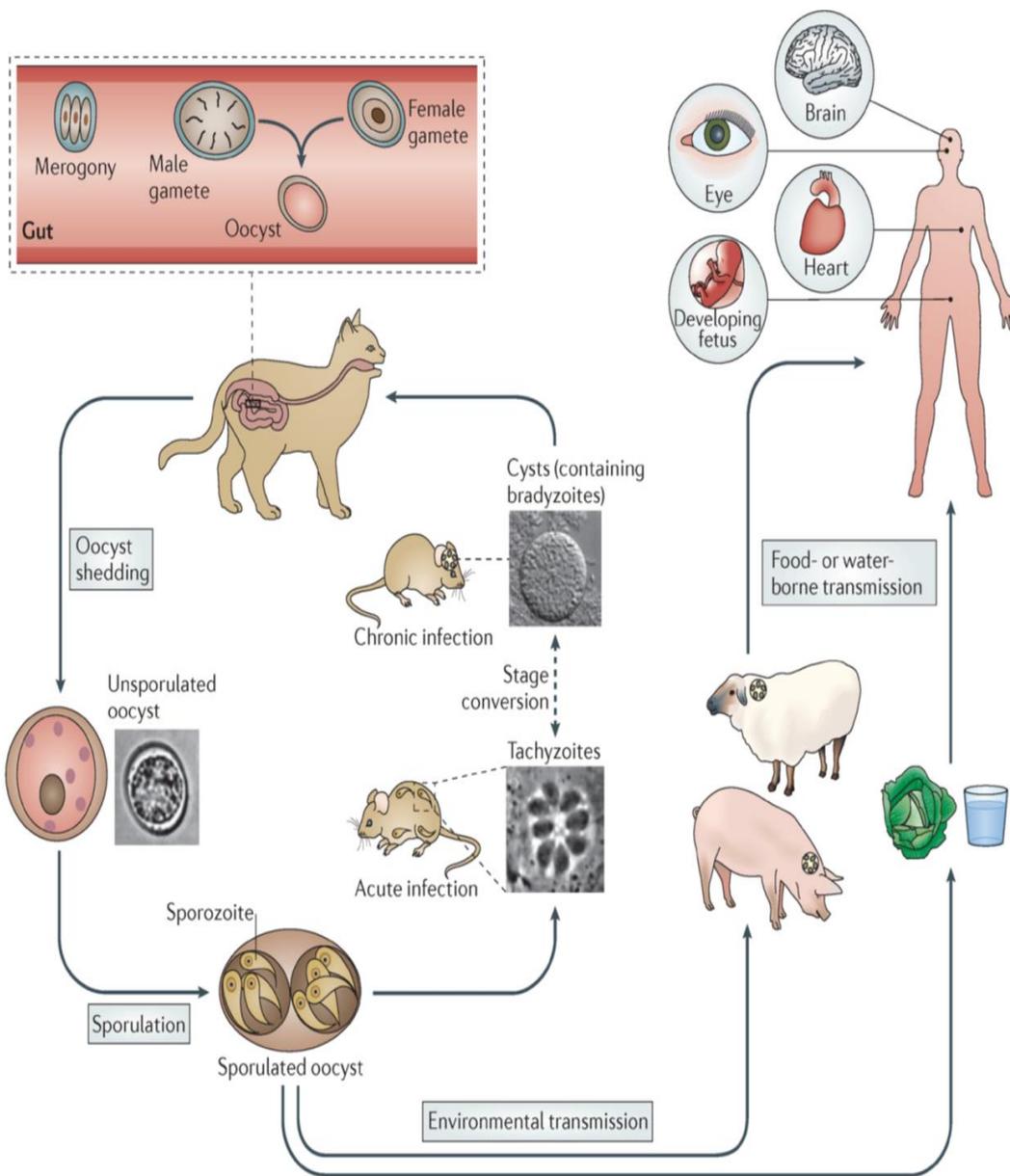


Figure 1 : Cycle de *Toxoplasma gondii* ; repris de (Hunter and Sibley,2012)

1. Tachyzoïtes

Ce stade du parasite est retrouvé chez les deux types d'hôtes définitif et intermédiaire. Le nom tachyzoïtes provient du grec « tacho » signifiant vite, puisque ceux-ci sont la forme de multiplication la plus active/rapide lors de la phase aiguë de l'infection. En effet le tachyzoïte se divise toutes les 6 à 9 heures, par un processus d'endodyogénie (Gordon et al, 2008) au sein de la vacuole parasitophore. Après 6 ou 7 cycles de division, la cellule infectée de hôte se lyse et libère entre 64 à 128 parasites en fin de cycle. Les parasites libérés infectent les cellules voisines et un

nouveau cycle lytique débute et ainsi de suite. C'est cette forme qui a été découverte chez « *ctenodactylus gundi* » (Frenkel, 1973 ; Meissner *et al*, 2002). L'aspect du tachyzoïte est semblable à un croissant de lune avec une extrémité antérieure effilée et une extrémité postérieure arrondie, et a une taille pouvant aller de 6 à 8 μm de long sur 3 à 4 μm de large. C'est la forme de multiplication la plus communément utilisée et étudiée en laboratoire de par sa facilité à maintenir en culture *in vitro*.

2. Kystes/ Bradyzoïtes

Les kystes contenant les bradyzoïtes se retrouvent chez les hôtes intermédiaires et correspond à la phase latente de l'infection. A l'inverse du tachyzoïte, le bradyzoïte à une réplication lente, d'où l'utilisation de « brady » lent en grec. Les bradyzoïtes résultent de la transformation du stade tachyzoïte et se regroupent au sein d'un kyste. La forme du bradyzoïte est similaire au tachyzoïte avec une taille de 7 x 1.5 μm . Les kystes mesurent ente 5 à 100 μm et siègent dans le système nerveux central, les muscles et la cornée, où ils persistent tout au long de la vie de l'hôte.

3. Oocystes/sporozoïtes

Les sporozoïtes sont issus de la multiplication sexuée se déroulant dans l'épithélium intestinal de l'hôte définitif, contenus dans une structure : l'oocyste. L'oocyste non sporulé a une forme sphérique de 10 à 12 μm , il sera sécrété en milieu extérieur où il va sporuler et atteindre une taille de 11 à 13 μm . L'oocyste sporulé peut persister plusieurs mois en milieu extérieur tout en gardant son pouvoir infectieux.

4. Phase asexuée /sexué

a) Cycle sexué

Le cycle sexué a lieu chez l'hôte définitif, qui se contamine par ingestion d'une proie contenant des kystes ou par des oocystes matures souillant l'eau et les végétaux. Les bradyzoïtes ou sporozoïtes libérés sous l'influence du système gastrique se transforment en tachyzoïtes. Ces derniers se différencient ensuite en mérozoïtes et le cycle sexué commence dans l'épithélium intestinal de l'hôte définitif. Les mérozoïtes se multiplient par schizogonie puis se différencient en gamontes (microgamètes mâles et femelles). La fécondation des macrogamètes par les microgamètes donne naissance à des oocystes immatures qui sont libérés dans la lumière intestinale. Les oocystes immatures (non sporulés) seront relargués dans le milieu extérieur par les fèces. Une phase de maturation appelée sporogonie a lieu. Cette phase consiste à une division du zygote diploïde par une méiose suivie de deux mitoses et aboutit à un oocyste mature contenant 8

sporozoïtes haploïdes (Dubey et al, 1998). Pouvant persister plusieurs mois dans le milieu extérieur, l'oocyste, de résistance tellurique, représente le mode de contamination le plus fréquent des hôtes intermédiaires herbivores.

b) Cycle asexué

Ce cycle commence de la même manière que le cycle sexué, les hôtes s'infectent après ingestion d'oocystes ou de kystes, les parois de ceux-ci se rompent et les sporozoïtes pénètrent dans les cellules épithéliales intestinales et se transforment en tachyzoïtes qui se disséminent dans l'organisme. Cette conversion de stade ainsi que cette dissémination correspondent à la phase aiguë de l'infection. Durant cette phase aiguë la réponse immunitaire se met en place, qui éliminera une grande majorité des tachyzoïtes. Pour échapper à la pression immunitaire les tachyzoïtes survivants migrent vers des tissus cibles pour se convertir en bradyzoïtes, résultant la formation des kystes, qui correspond à la phase chronique de l'infection.

Pour résumer, les tachyzoïtes sont impliqués dans les expansions de la population parasitaire chez l'hôte, et que les formes bradyzoïtes et sporozoïtes, protégés par leur structure, sont dédiées à la transmission entre les hôtes intermédiaires, voire définitifs.

C. Génome de *Toxoplasma gondii*

Le génome de *T.gondii* est haploïde dans les stades asexués. Il est constitué de 14 chromosomes dont la taille varie entre 2 et 8 megabases (Mb) d'ADN, pour un total de 65 Mb. Le parasite a également deux génomes extra-chromosomiques circulaires : celui de la mitochondrie et celui de l'apicoplaste (Fichera and Ross 1997 ; Wixlon and Williamson 1997). Le génome de *T. gondii* a été séquencé en 2003 et est disponible en libre accès sur ToxoDB, de plus ce site héberge, des données telles que des annotations des gènes, des études transcriptomiques et protéomiques.

D. Différentes souches

Bien qu'on considère qu'il existe qu'une espèce avec 98% d'identité génique, les souches de *T. gondii* diffèrent grandement notamment en matière de virulence (Sibley et Boothroyd, 1992). Les souches d'Europe, d'Amérique du Nord d'émergence récente se répartissent en trois génotypes majoritaires, dit de type I, II ou III avec des degrés de virulence variés en modèle murin (Su et al 2002, Saeij et al 2005). Ces souches ont été opposées aux souches dites atypiques, le plus souvent isolés en Amérique du Sud, en Afrique ou en Asie caractérisées une grande diversité génétique, le haut degré de polymorphisme corrélant souvent avec une virulence accrue, signe d'une faible adaptation à leurs hôtes intermédiaires (Su et al 2002).

Les différences entre les trois principaux génotypes sont les suivantes :

- la virulence chez la souris, qui est basée sur le calcul de la Dose Létale (DL) 50 et 100. C'est-à-dire de la dose minimale de parasites entraînant la mort de 50% à 100% des souris infectées. Lorsque la DL100 est égal à 1 tachyzoïte inoculé avec une mort survenant dans les 10 jours, la souche est considérée comme virulente.
- La vitesse de multiplication en culture cellulaire et la possibilité *in vitro* de conversion des tachyzoïtes en bradyzoïtes aboutissant à la formation de kystes.
- La capacité de migration et transmigration à travers les barrières biologiques.

1. Souches de Génotype I

Les souches de génotype de type I (RH et GT1) sont très virulentes chez la souris avec une issue mortelle systématique durant la phase aiguë de l'infection. En effet la DL100 des souches de type I est de 1 tachyzoïte viable qui provoque la mort des souris en moins de 10 jours avec une haute parasitémie. Ceci est lié au fait que ces souches ont une capacité de migration à travers les barrières biologiques supérieure aux souches de types II et III, avec une faible formation en bradyzoïte et donc à la formation de kystes. En ce qui concerne les cultures *in vitro*, la multiplication des parasites est en générale trois fois plus rapide que les souches de génotypes II et III. Les souches de type I sont trouvées, en générale chez l'Homme et rarement chez les animaux. Elles sont très rarement isolées et représentent moins de 10% des souches en Europe et en Amérique du Nord. Ces souches provoquent une toxoplasmose disséminée et souvent fatale chez les sujets immunodéprimés comme par exemple chez les malades du SIDA (Khan et al 2005). Elles sont aussi à l'origine de toxoplasmose congénitale sévères (Fuentes et al 2001) et associées aux infections oculaires acquises (Boothroyd et Grigg 2002).

2. Souches de Génotype II

Les souches de type II ont une virulence moyenne et sont responsables de la toxoplasmose chronique chez la souris (ME49, PRU, 76K). Elles ne sont pas mortelles durant la phase aiguë de la toxoplasmose sauf chez les souris naturellement sensibles comme les souris C57BL/6 ou dans le cas d'une infection avec une forte dose. La formation des bradyzoïtes et des kystes est supérieure par rapport aux souches de type I contrairement à la capacité de migration à travers les barrières biologiques qui est inférieure. Les souches de génotypes II sont à l'origine de la plupart des cas de toxoplasmose chez l'Homme, près de 80% des souches, mais aussi des infections chez les animaux domestiques et de rentes (Howe et Sibley 1995, Gross et al 1997, Ajzenberg et al 2002, Dardé et al 1992, Howe et al 1997, Richomme et al 2009).

3. Souches de Génotype III

Les souches qui sont avirulentes chez la souris, sont incluses dans la catégorie type III (VEG, CTG). On les retrouve rarement dans les populations étudiées. Les souches de type III sont fréquentes chez les animaux mais elles sont rarement associées à une pathologie (Howe et Sibley 1995). Une étude récente montre que la plupart des souches isolées à partir d'animaux en Afrique, appartenaient au génotype de type III (Mercier et al 2010). Chez l'Homme, les infections dues aux souches de type III sont rares et sont liées à la présence d'une immunosuppression.

4. Souches recombinantes et atypiques

Les souches recombinantes et atypiques représentent moins de 5% des souches totales de *T. gondii* (Howe et Sibley 1995). Ces souches aux génomes polymorphiques ont été isolées lors de cas de toxoplasmose humaine sévère chez des patients immunocompétents en Guyane (Carme et al 2002) et pendant une épidémie de toxoplasmose au Surinam (Demar et 2007). En Afrique, elles provoquent dans quelques cas des toxoplasmoses oculaires chez l'Homme et ont été identifiées comme étant issues de recombinaisons entre les génotypes de types I et III (type I/III). En Amérique du Sud, les souches atypiques semblent être plus représentées. Le plus souvent, elles sont isolées à partir d'animaux de rente, par exemple 40% des moutons testés aux USA (Dubey et al 2008), ou isolées à partir d'animaux sauvages comme les singes-écureuil (Carme et al 2009), les loutres en Californie centrale (Millet et al 2004, Conrad et al 2005), ou le jaguar en Guyane française (Demar et al 2008). En générale les souches recombinantes et atypiques sont plus virulentes chez la souris que le type II, et contiennent un mélange d'allèles ou de nouveaux allèles entiers dans certains *loci* (Ajzenberg et al 2002, Howe et Sibley 1995, Sibley et Boothroyd 1992). Bien que *T. gondii* ait un mode de reproduction sexué, il profite rarement de ce mode de reproduction en terme d'échanges génétiques. D'une part, car la réponse immunitaire de l'hôte (Reikwam et Lorentzen-Styr 1976) et d'autre part par la courte durée de la phase de gamétogénèse (Dubey et al 1970), ne permettant pas que les hôtes définitifs soient infectés par plusieurs souches en même temps.

Récemment, une étude portant sur une cohorte de 956 isolats et la combinaison des techniques de RFLP (restriction Fragments Length Polymorphism), des microsatellites et de séquençage de marqueurs spécifiques a permis de définir 138 génotypes, organisés en 15 haplogroupes définissants 6 clades majeures, Figure 2 (Su et al 2012).

manière que cette membrane est ensuite exclue du trafic membranaire intracellulaire isolant le parasite des autres compartiments vésiculaires de la cellule hôte. *T. gondii* possède trois organites sécrétoires qui interviennent de manière séquentielle avec les voies de signalisation et l'expression du génome de la cellule hôte. Ces organites sont propres au phylum *Apicomplexa*, les micronèmes, les rhoptries et les denses granules, qui déchargent successivement leur contenu en protéine impliqués dans la mobilité, l'adhésion de la cellule hôte, le processus d'invasion et l'établissement de la vacuole parasitophore (Carruthers, 2002 ; Black et Boothroyd, 2000).

1. Micronèmes :

Ce sont des organites apicaux les plus petits, en forme de bâtonnets mesurant 0,4x0,1µm. Ils apparaissent souvent légèrement arqués, probablement du fait d'une association avec la face cytoplasmique de l'IMC (Inner Membrane Complex). Les protéines sécrétées par les micronèmes sont appelées MIC, elles sont soit solubles, soit transmembranaires. Elles sont impliquées dans la reconnaissance et l'adhésions à la cellule hôte (Sheiner et al 2010). Ces protéines sont libérées lors du contact initial du pôle apical du parasite avec la cellule hôte, et participent à l'attachement via des récepteurs spécifiques de la cellule hôte (Carruthers, 2002).

2. Rhoptries :

Les rhoptries, en forme de croissant allongé mesurant de 1 à 4 µm de long, sont au nombre de 6 à 12 au pôle apical de chaque parasite. Les rhoptries contiennent un grand nombre de protéines appelées ROP et de lipides qui permettent au parasite de pénétrer dans les cellules hôtes et d'interférer avec 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 ROP sont relarguées avant et durant l'invasion et migrent vers 3 localisations principales : la lumière de la vacuole parasitophore, la membrane de la vacuole parasitophore ou vers le noyau de la cellule-hôte. Ces protéines sont essentielles à l'invasion, à la réplication du parasite et à l'interaction parasite-cellule hôte (Carruthers, 1999).

3. Denses granules :

Les denses granules sont des structures sphériques de 200nm de diamètre, qui apparaissent denses aux électrons en microscopie électronique, dispersé dans le cytoplasme, on en dénombre 15 par tachyzoïte. Les protéines des denses granules sont appelées GRA, retrouvées sous forme soluble ou insoluble (Adjogble et coll, 2004) et sont toutes des protéines sécrétées. Elles sont sécrétées pendant et après la phase d'invasion et restent solubilisées dans la lumière de la vacuole, soit associées à la membrane de la vacuole parasitophore permettant sa maturation (Nam 2009, Mercier

et al 2005) ou exportées au-delà de la vacuole dans le cytoplasme et aussi vers le noyau de la cellule hôte (Bougdour et al 2013, Braun et al 2013). Ces protéines jouent en rôle dans les modifications structurales de la vacuole et interviennent dans le recrutement des nutriments en s'associant à la vacuole parasitophore et dans l'inhibition des voies apoptotiques de la cellule hôte (Mercier et al 2005 ; Mercier et coll, 2002 ; Carruthers, 2002). Ces protéines participent à l'invasion, à la survie intracellulaire du parasite et à sa multiplication (Cha et coll, 2001).

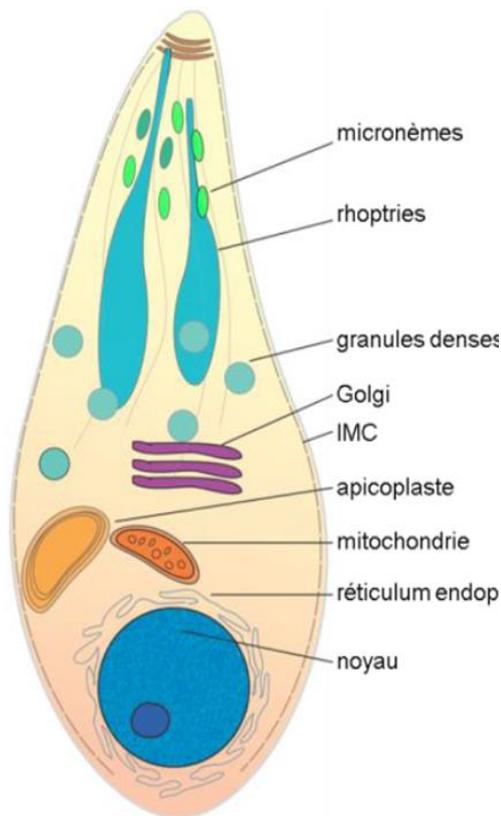


Figure 3 : structure de T.gondii Reprinte Klinger CM et al 2013, Copyright

F. Gene expression et régulation (régulation de l'expression génique)

Le cycle parasitaire de *T. gondii* comporte un mécanisme permettant des changements de formes et de stades qui sont au cœur de la pathogénèse et de la persistance du parasite chez l'hôte. Ce mécanisme, appelé interconversion, permet une différenciation réversible entre les formes tachyzoïte et bradyzoïte. On distingue plusieurs interconversions durant la pathogénèse, une première différenciation en tachyzoïte responsable de la phase aiguë. Puis une seconde différenciation se déroule en fin de la phase aiguë pendant l'enkystement avec une différenciation de tachyzoïte en bradyzoïte mettant en place la phase chronique. Une autre différenciation a lieu lors de réactivation des kystes, les bradyzoïtes se différencient en tachyzoïtes. L'interconversion est associée à des changements morphologiques du parasite, mais affecte également l'expression des antigènes spécifiques à une forme parasitaire, et met en route de nouvelles voies métaboliques

(Ferguson et Hutchison, 1987 ; Denton H et al., 1996). On estime entre 2 à 5%, la proportion de gènes qui ont une expression spécifique selon le stade tachyzoïtes (SAG1, SAG2A, SAG2B, LDH1, ENO2, etc.) ou bradyzoïte (BSR4, SAG2C, SAG4, BAG1, LDH2, ENO1, etc.) (Lyons et al., 2002 ; Fritz et al, 2012). Le passage d'une forme parasitaire à l'autre reposerait alors sur un équilibre strict entre activation et répression de grandes familles de gènes (Cleary et al., 2002 ; Singh et al., 2002; Radke et al., 2005). Le processus de régulation transcriptionnelle est le mécanisme majeur dans la régulation spécifique de l'expression des gènes chez *T. gondii*, et de ce fait dans son engagement vers l'une ou l'autre de ses formes. L'interconversion semble donc mettre en jeu un système complexe de contrôle transcriptionnel dont les mécanismes moléculaires sont encore inconnus. Les processus de transcriptions des *Apicomplexa* restent pour l'instant peu décrits, et reste relativement basique et rudimentaire par rapport aux eucaryotes. Chez *T. gondii*, la transcription est extrêmement dynamique, avec de nombreux ARN messagers (ARNm) présents uniquement dans un seul stade. Les études du transcriptome du bradyzoïte de *T. gondii* ont montré une corrélation entre les niveaux d'ARNm et l'expression de protéines spécifiques de ce stade, ainsi que des modifications radicales des pools d'ARNm selon le stade parasitaire (Radke et al., 2005 ; Cleary et al., 2002 ; Singh et al, 2002). Les *Apicomplexa*, dont *T. gondii*, semblent quasiment dépourvus de facteurs de transcription, alors que la proportion de facteurs de transcription semble augmenter avec la complexité biologique de l'organisme, ce phylum ne semble pas suivre cette règle (Iyer et al 2008 ; Messina et al., 2004). On observe aussi une absence des domaines de liaison à l'ADN typique de ceux retrouvés chez les eucaryotes HTH, bip, homéo, bHLH ou Fkh, seuls quelques rares domaines de type Zinc Finger ont pu être identifiés (Templeton et al., 2004). Plus récemment, par analyse bio-informatique, des facteurs de transcription végétale de la famille *Apetela2/ethylene response factor* (AP2/ERF) ont été découverts (Balaji et al., 2005 ; Oakley et al., 2007; Iyer et al., 2008). Leur acquisition est probablement une conséquence de l'endosymbiose ancienne d'un plaste non-photosynthétique. Plusieurs protéines ApiAP2 peuvent réguler transcriptionnellement un même gène du fait des multiplicités des séquences d'ADN spécifiques en amont de celui-ci. Ces régulations peuvent être positives ou négatives. De plus, chez *T. gondii* on recense un vaste répertoire d'enzymes impliquées dans le remodelage de la chromatine, ces machineries sont apparemment associées aux facteurs ApiAP2 qui les dirigent vers leurs gènes cibles (Sautel et al, 2007 ; Bougdour et al, 2010 ; Sullivan et Hakimi, 2006). Parmi les diverses modifications possibles des histones, la régulation de l'acétylation des histones s'avère particulièrement cruciale pour déterminer les profils d'expression génique spécifiques des stades parasitaires. Ce type de régulation a été étudié et a montré que le facteur ApiAP2 TgCR350 est associé à la déacétylase HDAC3 (Saksouk et al, 2005).

G. Les familles Histone acétylase et histone désacétylase de *T. gondii*

Comme pour tout être vivant, l'expression des gènes de *T. gondii* est régulée pendant toutes les étapes de son développement et pour assurer sa survie chez son hôte. Ces régulations incluent des régulations épigénétiques qui sont dépendantes de mécanismes essentiellement moléculaires et contribuent à l'expression de l'activité d'un gène. Les histones, protéines autour desquelles s'enroulent l'ADN, sont très sensibles à des modifications post-traductionnelles et en particulier aux modifications induites par acétylation (Wang et al, 2005 ; Frickel et al, 2008 ; Blanchard et al 2008). Les modifications post traductionnelles incluent aussi la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la poly-ADP-ribosylation et la sumoylation (Duquesne et al, 1991). Ces modifications entraînent des changements de la structure de la chromatine soit en modulant les interactions des protéines avec l'ADN ou soit en permettant le recrutement de protéines spécifiques. Elles se traduisent par des marques sur la chromatine qui sont lues par des régulateurs de la transcription sous la forme d'un code d'histone unique (Saavedra et al, 1991). L'acétylation a pour conséquence le gain ou la perte d'un groupement acétyle par une histone acétylase (HAT) ou par une histone désacétylase (HDAC), réciproquement. Si l'acétylation des histones induit la neutralisation de la charge positive des queues N-terminales de l'histone et conduit à une décondensation de la chromatine favorisant l'activité transcriptionnelle, l'acétylation des histones rétablit la charge positive de la queue N-histone de l'histone, ce qui provoque un compactage de l'ADN sur l'histone et réprime l'expression de gènes. Chez les parasites protistes, les quatre histones principales (H2A, H2B, H3 et H4) sont présentes, mais l'histone de liaison H1 semble être absente chez les Apicomplexa (Dalmaso et al, 2012). Alors que les lignées H4 et H2B sont quasi invariantes, H2A et H3 ont de nombreuses variantes et chez les Apicomplexes dont *T. gondii*, une nouvelle variante de la famille H2B appelée H2Bv a été décrite (Dalmaso et al, 2006). Chez les mammifères, les HDAC ont été regroupées en quatre grandes classes (Gregoretto et al, 2004 ; Carey et La Thangue, 2006) ; XU et al, 2011), les classes I et II comprenant des enzymes qui partagent des domaines catalytiques similaires, un mécanisme catalytique dépendant de Zn^{2+} et sont sensibles à l'inhibiteur de la désacétylase Trichostatin A. Les protéines de classe III apparentées au Sir2 (car elle partage un domaine avec la levure) contiennent 7 membres (sirtuins : SIRT1–7). Elles se distinguent des autres HDAC en induisant la désacétylation de la lysine en utilisant comme cofacteur le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) (XU et al, 2011 ; Guarente, 2000). Enfin HDAC11 reste à ce jour le seul membre connu appartenant à la classe IV (Gregoretto et al, 2004). Dans le génome de *T. gondii* est dénombré des gènes codant pour cinq homologues d'HDAC de classe I ou II ainsi qu'un homologue du sous-type Sir2 (classe III) et une HDAC3 identifiée en tant que

membre d'un groupe distinct de protéines d'histone désacétylase de classe I apparentée à Rpd3. Vu l'importance du rôle des HDAC dans l'activation et la répression des gènes codant pour des protéines ayant un impact sur la prolifération et la survie des tachyzoïtes, l'inhibition de l'activité de ces enzymes est une piste thérapeutique explorée depuis dix ans et qui s'appuie sur l'expérience d'utilisation d'inhibiteur d'HDAC dans le traitement de cancer dans cas de lymphome à cellules T persistant ou réfractaire (Rangwala et al, 2012). Depuis il a été montré que des inhibiteurs d'HDAC sont également capables d'interférer avec les voies de signalisation intracellulaires conduisant à la mort cellulaire par apoptose, l'activation sélective de protéines intervenant dans la régulation de la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) (Xargay-Torrent et al, 2011) et pourrait induire un arrêt du cycle cellulaire en G1 / S (Noh et al, 2011). Les premières études d'utilisation d'inhibiteurs d'HDAC pour limiter la prolifération de *T. gondii* montre que les térapeptides cycliques sont en générale plus efficaces que la trichostatine A, et la pyriméthamine (Darkin-Rattray et al, 1996 ; Strobl et al 2007 ; Bougdour et al, 2009). L'exposition d'ADNc de *T. gondii* à l'inhibiteur HDAC : API, révèle que l'activité de transcription au cours du développement du bradyzoïte est largement affectée (Boyle et al, 2006). L'inhibiteur FR235222 qui cible sélectivement TgHDAC3 semble provoquer une induction de la différenciation des bradyzoïtes à des concentrations sublétales, attestant que TgHDAC3 est impliqué dans le phénomène d'interconversion (Bougdour et al,2009). Il a été démontré que l'activité inhibitrice de FR235222 est dépendante de l'insertion de deux résidus dans le site catalytique de TgHDAC3 qui est présent exclusivement dans la famille des protéines HDAC3. Dans le laboratoire du Docteur Ali Hakimi, l'utilisation de tests Chip-chip a permis d'identifier 369 gènes de *T. gondii* contenant des nucléosomes hyper-acétylés, dont un tiers sont exprimés au stade sporozoïte et / ou bradyzoïte du parasite lorsque ce dernier était en présence de FR235222 (Bougdour et al,2009). Il semble que FR235222 et ses dérivés affecteraient des bradyzoïtes différenciés in vitro (Maubon et al, 2010) et que le nombre de kyste est très fortement diminué chez certaines souris infectées par *T. gondii* et traités par FR235222. Des résultats complémentaires indiquent que la division en cellules filles est altérée par l'inhibition de TgHDAC3, ce qui est cohérent avec un ralentissement transitoire de la phase S observée et la présence de bradyzoïtes matures avec un arrêt du cycle cellulaire en G1 / G0 (Jerome et al, 1998).

H. Réaction immunitaire de l'hôte.

T. gondii, comme tout microorganisme pathogène, provoque une infection induisant une réponse immunitaire innée et adaptative. Les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent ces réponses immunes permettent le contrôle de la réplication et de la dissémination du parasite. Suite à l'infection, une réponse innée se met en place et qui sera complétée par une

importante réponse adaptative de type Th1 qui aboutit à une protection à long terme contre une éventuelle réinfection

1. Réponse immunitaire innée

L'originalité dans le déroulement de l'infection par *T. gondii*, est la relation subtile que ce parasite établit, avec le système immunitaire de son hôte. Lors de l'ingestion par voie orale de *T. gondii*, la première barrière que franchira le parasite est celle formée par des cellules épithéliales intestinales composées d'entérocytes. Brièvement, *T. gondii* se lie aux entérocytes, les infecte, se multiplier par division binaire et via un processus complexe présenté précédemment, les tachyzoïtes éclatent l'entérocyte qui les hébergeait et infectent à leur tour les cellules adjacentes y compris les cellules immunitaires comme les monocytes et les cellules dendritiques. De leur côté, les entérocytes parasités répondent à l'infection de *T. gondii* en sécrétant de l'oxyde nitrique (NO), des cytokines et des chémokines. L'oxyde nitrique libéré par les entérocytes inhibera la réplication du parasite et sa pénétration dans les cellules qui tapissent la *lamina propria* et les ganglions mésentériques. (Hayashi, 1996 ; Yap, 1999). Les chémokines produites permettent le recrutement des neutrophiles, macrophages, monocytes, cellules dendritiques (DC), et lymphocytes au site de l'infection (Mackay, 2001, Kasper et al., 2004). Les neutrophiles jouent un rôle dans la reconnaissance et la neutralisation, ils se mobilisent et migrent rapidement vers le lieu de l'infection (Bliss et al, 2000) et sont capables de sécréter des chémokines et des cytokines proinflammatoires comme l'IL12 et le *tumor necrosis factor- α* (TNF) (Denkers et al, 2003). Dans des modèles murins, il est démontré que les neutrophiles produisent aussi de l'interféron gamma (INF- γ), puissant agent inflammatoire et cytokine majeure dans l'immunité anti-toxoplasmique, pendant les premières phases de l'infection de *T. gondii* (Sturge al, 2013). Ces cellules participent ainsi à la résistance à *T. gondii* dans les stades précoces de l'infection et contribuent à l'élimination partielle du parasite. Les macrophages ont un rôle pivot dans la détection et l'élimination par phagocytose, en présentant des peptides antigéniques en association avec des antigènes d'histocompatibilité et des molécules co-stimulantes. Ces cellules initient une forte réponse inflammatoire par la synthèse de molécules pro-inflammatoire telles que l'IL12. Les DC sont des cellules sentinelles, elles interviennent dans la phase précoce de l'infection en participant à la reconnaissance du parasite. Elles induisent la production de chémokines et cytokines pouvant attirer et activer d'autres types cellulaires comme les macrophages, les cellules NK et les lymphocytes T. Ces cellules sont la principale source d'IL2, cytokine jouant un rôle majeur dans la résistance de l'hôte au parasite (Gazzinelli et al 1993) et aussi dans la réponse spécifique contre le pathogène. Ce qui est particulier au cours de cette phase précoce de l'infection est que la mise en place des réponses innées et intestinales de l'hôte qui visent

à lutter contre l'infection de *T. gondii*, profitent à ce dernier pour établir son cycle infectieux. En effet, il est probable que des monocytes et des DC parasités dans les plaques de Peyer et la *lamina propria* soient drainés dans les ganglions mésentériques et rejoignent la voie sanguine permettant ainsi au parasite de coloniser d'autres tissus comme la rate, le poumon, le foie et le cerveau. D'autre part, il est important de mentionner que le parasite lui-même participe à la mise en place des réponses innées en induisant précocement la synthèse d'IL12 par les DC et les macrophages, (Sher et al, 1998). La libération précoce d'IL12 induirait à son tour la production d'IFN γ , par les cellules Natural Killer (NK) et les cellules T (Hunter et Remington, 1995 ; Gazzinelli et al , 1993 et 1994) . L' IFN γ produit agirait en synergie avec le TNF- α pour activer les macrophages (Sibley et al. 1991). L'activation de ces derniers serait cruciale pour limiter la multiplication du parasite en augmentant la production de radicaux libres et d'oxyde nitrique (NO) (Miller et al., 1999) avant la mise en place de l'immunité adaptative.

2. Réponse immunitaire adaptative

L'immunité adaptative participe à la résistance et la protection contre le développement de la toxoplasmose. Les acteurs principaux de la réponse immunitaire adaptative sont les lymphocytes. Ces cellules ont besoin d'un temps de « priming » pour réagir contre le pathogène qui est assuré par l'intermédiaire des DC et de cytokines. Pour rappel, l'induction par un pathogène d'une réponse TH1/TH2 dépend de plusieurs signaux stimulateurs versus inhibiteurs délivrés par les cellules dendritiques, qui régulent la sécrétion des cytokines des lymphocytes T primés. Une fois « primé » ou stimulé, ces cellules gardent la mémoire contre le pathogène. C'est-à-dire que en cas de réinfection avec le même pathogène, ces cellules répondront plus rapidement pour l'éliminer.

Au cours de l'infection par *T. gondii*, les DC jouent un rôle majeur dans le déclenchement et la polarisation des réponses immunes spécifiques et dans la protection à long terme durant les infections chroniques (Yap et al, 2000). Ces cellules présentatrices d'antigènes induisent une réponse cellulaire caractérisée par une réponse de type TH1, par un profil cytokinique TNF- α , IFN γ et l'IL12 (Sayles et al, 2000), et l'activation des lymphocytes CD4+ et CD8+. Les macrophages qui ont été activées contribuent eux aussi à l'initialisation de cette immunité de type TH1 Ce profil cytokinique participe au contrôle de la multiplication des tachyzoïtes et à l'initialisation et le maintien de l'immunité à médiation cellulaire (Subauste et al, 1998 ; Denkers, 2003). Les lymphocytes CD4+ jouent un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire alors que les lymphocytes CD8+ sont les effecteurs majeurs luttant contre le parasite. Le contrôle de l'infection dépend principalement de la production d'IFN γ par les lymphocytes. Le rôle ces

lymphocytes CD8⁺ est primordiale dans la résistance et la protection à l'infection et jouent un rôle en continue dans la phase chronique de l'infection en limitant la réactivation de kystes (Suzuki et al 1990, Suzuki et Remington 1990), cette réactivation étant contrôlé par le maintien de la production d'IL12 par les macrophages (Yap et al, 2000). Il est à noter que durant l'établissement de l'immunité contre *T. gondii*, à nouveau le parasite profiterait de la réponse de l'hôte. Il est en effet rapporté que l'INF- γ produit favoriserait la transformation des tachyzoïtes intracellulaires en bradyzoïtes au niveau des kystes et l'enkystement au niveau du tissu musculaire et du cerveau.

II. Objet d'étude

La retronversion des différents stades de *T.gondii* est au cœur de la pathogénèse. Les stades tachyzoïte, bradyzoïte et sporozoïte sont définis par l'expression spécifique de certains gènes permettant d'identifier précisément chaque stade. Même si certaines études démontrent l'importance des mécanismes de retronconversion au niveau de la transcription des gènes impliqués entre les stades, ce phénomène spécifique aux Apicomplexes restent à explorer y compris une étude complète et approfondie des gènes qui y sont associés. Il est encore difficile d'induire des kystes par manipulation *in-vitro* et par conséquent d'analyser le stade bradyzoïte et d'étudier l'ensemble des gènes et de leurs modifications qui conduisent au stade bradyzoïte et à son maintien. En laboratoire, les tachyzoïtes mis sous exposition à une différence de Ph ou en présence d'IFN- γ , se différencient en bradyzoïte, toutefois la différenciation induite n'est pas optimale. Récemment, l'équipe du Docteur Ali Hakimi a montré que l'utilisation d'un composé (drogue) identifié sous le nom de FR235222 induit la différenciation tachyzoïte en bradyzoïte par inhibition des HDAC. L'identification de composés altérant l'épigénome du parasite et induisant différents stades de son cycle biologique est une voie de recherche originale pour d'une part, l'étude du phénomène de retronversion et d'autre part la caractérisation de certains gènes spécifique du stade bradyzoïte et/ou impliqués dans la formation des kystes. La caractérisation d'autres composés/drogues possédant les propriétés d'interférer au niveau épigénétique sur les HDAC est nécessaire pour implémenter les connaissances des gènes de *T.Gondii* impliqués dans son cycle de vie. C'est dans ce contexte qu'un second composé possédant des propriétés capable d'interférer au niveau de l'épigénome de *T.gondii* par inhibition des HDAC, nommé I2, a été retenu comme base d'étude de ma thèse. La caractérisation fine de la régulation épigénétique des gènes impliqués dans les différents stades de vie du parasite constitue aussi une voie prometteuse pour le développement de thérapie pour lutter contre ce parasite. Les résultats préliminaires mettent en évidence un phénotype présent que dans certaines souches et révèlent la fonction de gènes spécifiques selon les souches qui restent à confirmer.

Les interactions moléculaires entre *T.gondii* et son hôte restent encore à être élucidées. Il y a tout un jeu de régulation qui est mis en place pour la survie de la cellule et/ou de *T.gondii*. L'étude de certains gènes et/ou protéines de *T.gondii* est primordiale pour comprendre certains mécanismes de la pathogénèse, comme par exemple l'échappement du contrôle du système immunitaire.. Il est également important de comprendre, alors que *T.gondii* infecte tout type de cellules nucléées, quels sont les facteurs qui conditionnent l'observation que certains de ses gènes ne s'expriment que dans certains type de cellules et aussi à travers les espèces.. Des modèles *in-vitro* et *in-vivo* de gènes

invalidés par le système de CRISP-CAS9, qui permet de fournir des informations sur la fonction de la protéine codée par un gène donné et d'élucider certaines interactions hôte/pathogène sont appropriés pour répondre aux observations décrites ci-dessus. Il est également important d'analyser les conséquences de l'invalidation d'un gène et de vérifier si la perte de fonction est compensée par l'expression d'un autre gène ou une autre protéine, en d'autres termes la capacité d'adaptation du parasite. Les travaux que nous avons entrepris en utilisant l'invalidation d'un gène par le système CRISP-CAS9, nous ont permis de mettre en évidence un gène impliqué dans la croissance du parasite et qui semble contribuer à la résistance de *T. gondii* à un traitement IFN- γ .

III. Résultats

A. Composé I2

1. Résultat préliminaire HMS-I2 par l'équipe du Pr. Robin C. Allshire

Comme indiqué précédemment, l'hétérochromatine, de par sa structure condensée et conservée durant tout le cycle cellulaire, joue un rôle essentiel dans la répression des gènes, l'intégrité du génome et la ségrégation des chromosomes. Par ailleurs, il existe un ensemble d'éléments régulateurs des processus épigénétiques qui sont de petites molécules mobiles appelées micro ARN (miRNA) ou des petits ARN interférents décrits pour inhiber l'expression de gènes avec une grande spécificité de séquence. Dans la levure à fission, *Schizosaccharomyces pombe*, la formation de l'hétérochromatine est connue et les complexes protéiques conservés ont un effet sur la formation d'hétérochromatine via le recrutement d'un ARN interférent de l'histone H3 lysine 9 méthyltransférase. Un des axes de recherche investigué pour lutter contre des pathogènes est d'inhiber la formation d'hétérochromatine en recherchant des molécules qui interfèrent avec les complexes moléculaires impliqués dans la formation de l'hétérochromatine. Pour atteindre cet objectif, l'équipe de Robin C. Allshire (E. Castonguay et al, 2015) a dans un premier temps réalisé un criblage cellulaire de la perte de désactivation d'un gène rapporteur kanMX inclus dans de l'hétérochromatine centromérique de levure à fission en testant en tant qu'inhibiteur des molécules capables d'interférer avec les modulateurs de l'intégrité de l'hétérochromatine. Pour rappel, l'expression de kanMX confère une résistance à G418, et comme dans les cellules cen1-kanMX, le gène rapporteur est bloqué par l'hétérochromatine environnante, ces cellules présentent une sensibilité à G418. De plus, l'hypoacétylation d'histones est également une caractéristique de l'hétérochromatine, et une augmentation de l'acétylation de l'histone-lysine devrait accompagner la perte de l'inactivation du gène du marqueur centromérique. Le criblage des cellules cen1-kanMX a permis d'identifier deux composés, 2- (2,3-dihydro-1,4-benzo [b] [1,4] dioxin-6-yl) -6-méthylimidazo [1,2-a] pyridine et N- (1-benzo - [b] thiophén-2-yl) -4- (2-chloro-6-fluorobenzyl) pipérazine-1-carboxamide qui ont été dénommés, HMS-I1 et HMS-I2 respectivement. Ces deux composés en augmentant la résistance des cellules cen1-kanMX à G418 ont été considérés comme des inhibiteurs de la répression génique médiée par l'hétérochromatine constitutive. Dans un second temps, les auteurs, ce sont attachés à démontrer les caractéristiques de ces deux composés. Brièvement, les auteurs montrent que ces deux composés, provoquent une diminution de la méthylation dans tous les *loci* régulés par la méthylation de l'histone. Cette diminution est observée au niveau des répétitions centromériques, des régions télomériques ainsi qu'au niveau du locus sexuel, et ceci est compatible avec l'inhibition de l'histone désacétylase (HDAC) Clr3 et /ou Sir2. Une augmentation de l'acétylation de H3K9 et de H3K14 sur cen1-kanMX dans des cellules traitées

avec HMS-I1 et HMS-I2 cultivées en présence de G418 a été notée. Ces résultats permettent d'affirmer que les produits HMS-I1 et HMS-I2 augmentent la résistance des cellules cen1-kanMX au G418 par une perturbation générale de l'hétérochromatine centromérique et une expression concomitante élevée du gène de résistance kanMX intégré. Des expériences complémentaires indiquent que les deux composés modifient également l'activité du complexe répresseur Snf2 / HDAC contenant Clr3 (SHREC) et inhibent *in vitro* l'activité de HDAC Clr3 de classe II de la levure de fission. Globalement, les analyses convergent et montrent que le composé HMS-I2 atténue la répression génique médiée par l'hétérochromatine en modèle fongique ou végétal et pas dans les cellules humaines au contraire du composé HMS-I1.

Comme l'analyse de la structure chimique du composé HMS-I2 suggère que son mécanisme d'action est probablement différent de celui des inhibiteurs canoniques classiques des HDAC, du fait que HMS-I2 ne présente pas des caractéristiques évidentes de chélation du zinc et que ce composé affecte l'intégrité de l'hétérochromatine *in vivo* en interférant sur des interactions protéiques au sein du complexe HDAC et plus particulièrement des HDAC de classe II, il nous est apparu intéressant de définir le mécanisme d'action de ce nouveau composé I2 et de tester s'il était capable d'altérer la croissance de *T. gondii*.

2. Résultats préliminaires : transcriptomique.

Une étude transcriptomique a été réalisée pour observer si la transcription de gènes de *T. gondii* en présence du composé I2 serait altérée négativement ou positivement. Les résultats de cette étude sont résumés dans la Figure 4. Brièvement, quand le composé I2 est ajouté au milieu après 24h post infection, la transcription de plusieurs gènes est réprimée (indiqué en orange dans la figure 4) alors que plusieurs gènes sont surexprimés/activés (indiqué en bleu dans la figure 4). L'ensemble des résultats de cette première analyse montre que les gènes dont la transcription est altérée codent pour des fonctions très différentes et permet de conclure que le composé I2 a une action sur la transcription de certains gènes chez *T. gondii*. Une analyse comparative transcriptionnelle entre les composés I2 et FR235222, reconnu comme un inhibiteur HDAC (Bougdour et al., 2009), a été réalisée afin de déterminer quels sont les gènes de *T. gondii* qui sont régulés de manière spécifique par le composé I2. Les résultats résumés dans la Figure 5 montrent que les composés I2 et FR235222 induisent l'expression de 39 et 25 protéines réciproquement dont 14 sont surexprimées en présence des deux composés. Cette analyse comparative montre que le composé I2 ne régule pas les mêmes gènes que le composé FR235222 et que le composé I2 a une action spécifique sur la régulation de certains gènes exprimés par le parasite.

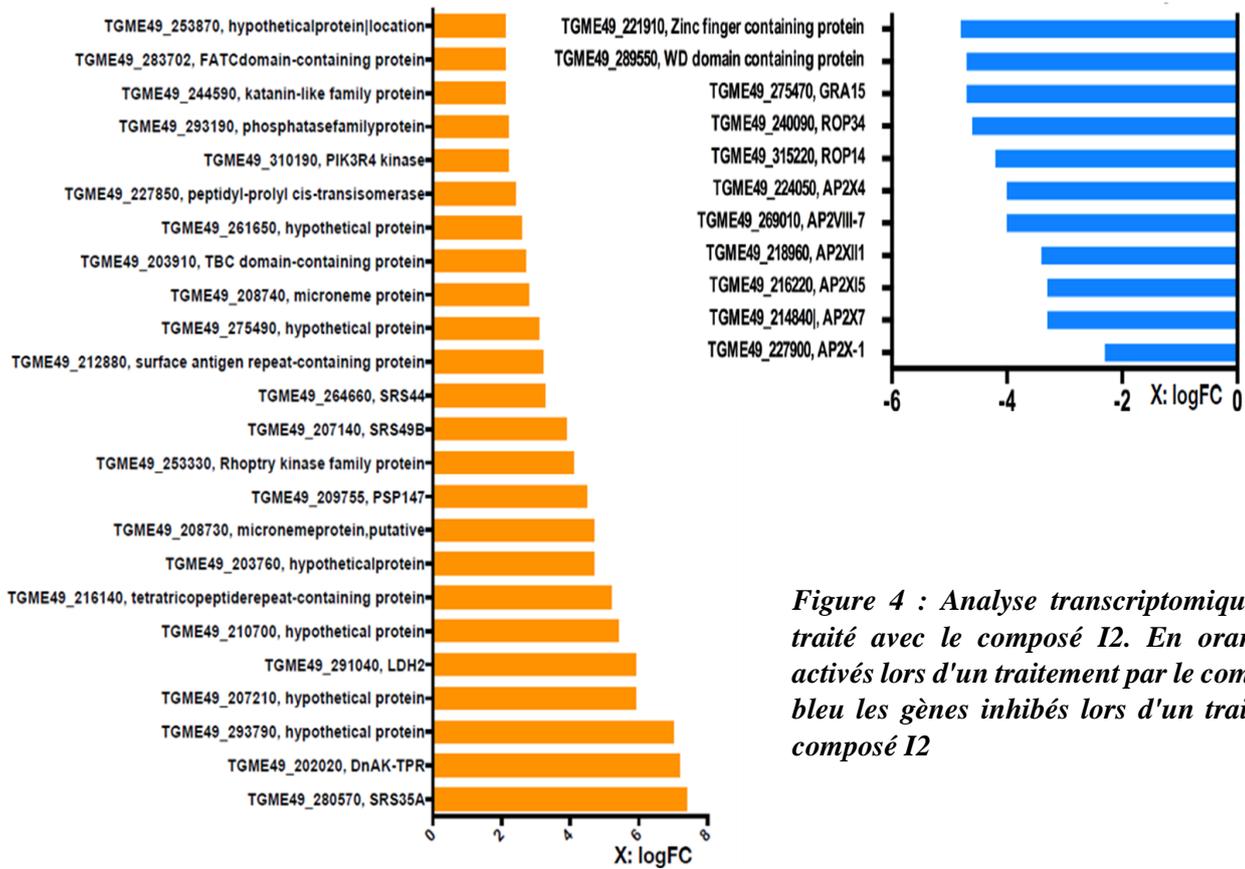


Figure 4 : Analyse transcriptomique de *T.gondii* traité avec le composé I2. En orange les gènes activés lors d'un traitement par le composé I2. Et en bleu les gènes inhibés lors d'un traitement par le composé I2

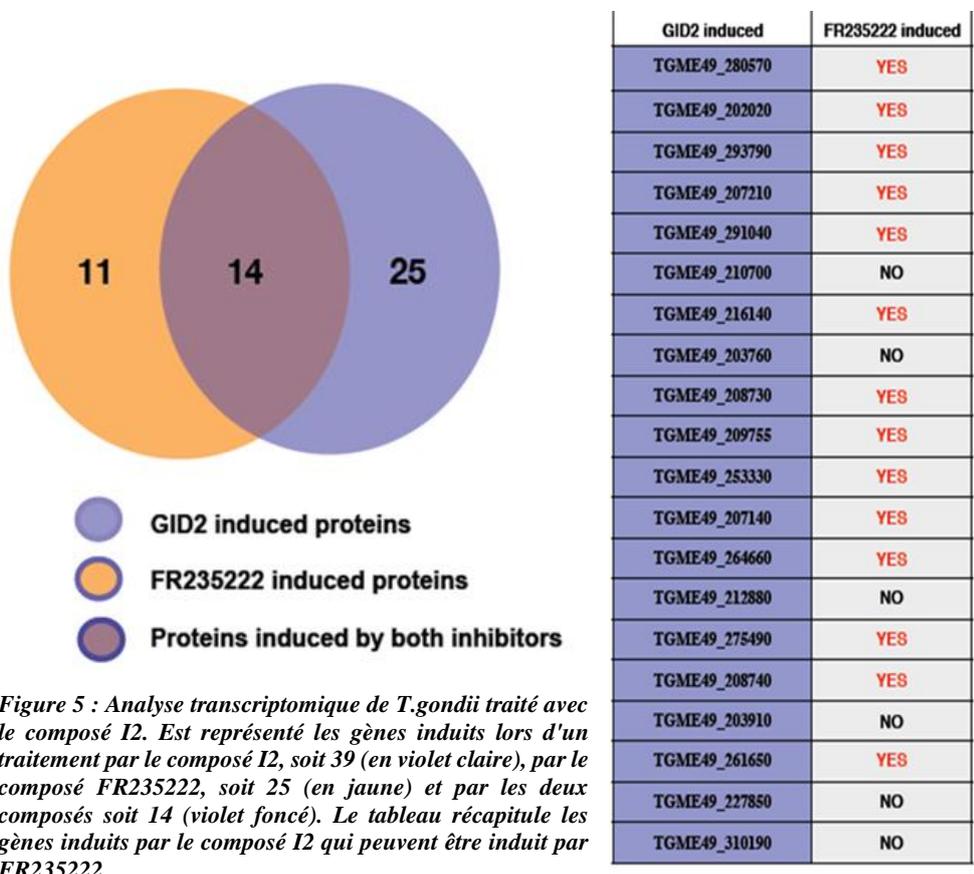
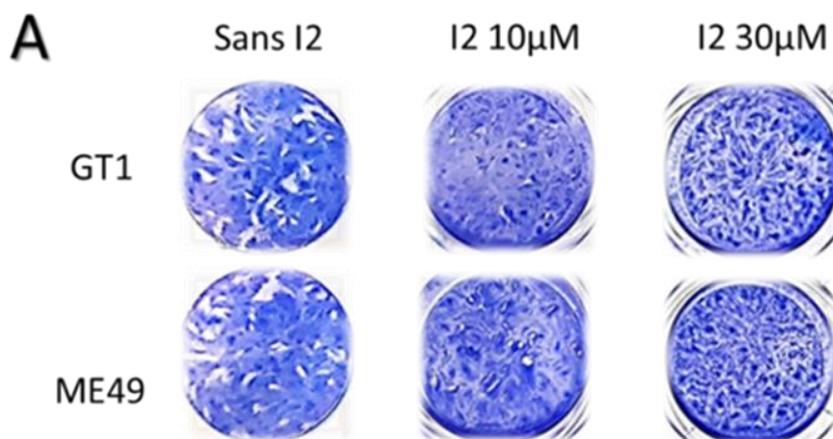


Figure 5 : Analyse transcriptomique de *T.gondii* traité avec le composé I2. Est représenté les gènes induits lors d'un traitement par le composé I2, soit 39 (en violet clair), par le composé FR235222, soit 25 (en jaune) et par les deux composés soit 14 (violet foncé). Le tableau récapitule les gènes induits par le composé I2 qui peuvent être induit par FR235222.

3. Le composé I2 inhibe la croissance chez *T. gondii* de manière souche indépendante

Nous avons utilisé plusieurs souches de parasites de type I (GT1) et de type II (ME49) pour caractériser l'inhibition du composé I2 sur la survie du parasite. Pour ce faire, des fibroblasts humains (HFFs) ont été infectées avec ces différentes souches de parasites pendant 24h puis incubées en présence du composé I2 à 30 μM pendant 24h. Nous avons constaté qu'en présence de la drogue, les parasites arrêtent leur croissance. Pour confirmer cette altération du cycle de vie du parasite, nous avons réalisé des *plaque assays*. Comme décrit précédemment des HFFs sont infectées avec des parasites, puis la drogue est ajoutée à 10 μM ou à 30 μM après 24h d'infection. Dans cette série d'expériences les parasites ont été laissés environ 1 semaine en présence ou pas de la drogue. Classiquement, après une semaine d'infection, des plages de lyse cellulaire apparaissent en absence de traitement. Au cours de ces expériences nous avons observé que le nombre et l'aire de plages de lyse entre les parasites traités et les parasites non traités sont significativement différents (Figure 6). En effet, on observe un nombre significativement réduit de plages de lyses et de leurs surfaces quand les parasites sont traités avec la drogue I2 à 10 μm , et aucune plage de lyse est détectable dans les cellules infectées par *T. gondii* quand ce dernier est en présence du composé I2 à 30 μM (Figure 6).

Ces observations ont été relevées quel que soit la souche utilisée. Ces données suggèrent que le composé I2 réduit ou stoppe la croissance du parasite, et que l'action de I2 sur la croissance de ce parasite est stable et durable pendant au moins 10 jours.



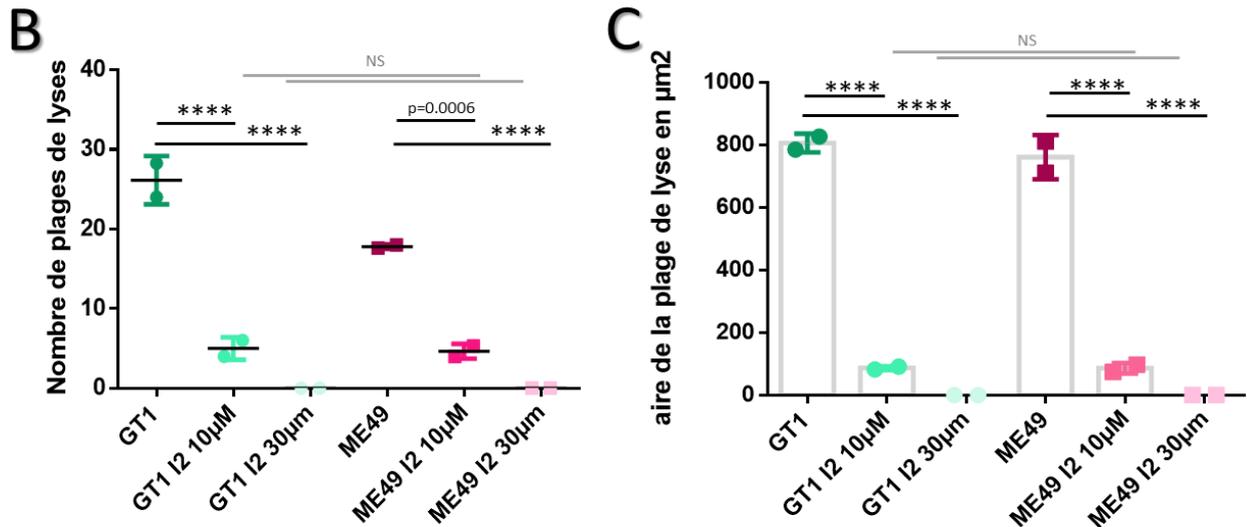


Figure 6 Analyse des plaques assays Figure 6A. Les HFF sont infectées avec les souches GT1 et ME49, puis après 24h d'infections les cellules sont traitées avec le composé I2 à 10µM et 30µM pendant une semaine. Les HFF sont par la suite colorées au bleu de Coomassie pour révéler les plages de lyse. Figure 6B Graphique représentant le nombre de plage de lyse pour les différentes conditions. Chaque point représente la moyenne d'une expérience faite en triplicata. Figure 6C Graphique représentant la comparaison de l'aire des plages de lyse pour chaque condition. Chaque point représente la moyenne d'une expérience faite en triplicata. **** est égale p value de $\leq 0,0001$

Afin de détailler les caractéristiques de ce phénotype d'inhibition de croissance, nous avons compté le nombre de parasites par vacuoles sur des cinétiques de temps d'exposition du composé I2 plus courtes s'étalant entre 48 et 72 heures d'infection avec des traitements de 24 à 48 heures de la drogue I2, réciproquement. Sachant que *T. gondii* se divise par endodyogénie et avec un temps de génération d'environ 8h, on peut estimer le nombre de cycle de retard provoqué par la drogue I2. Nous avons constaté comme dans l'expérience précédente que le parasite à un retard de croissance significatif suite à un traitement de 24h à 30 µM. Cependant si on allonge le temps d'infection du parasite à 72 heures avec un traitement de I2 pendant 48h et qu'on compare le nombre de parasites par vacuole par rapport à une infection de 48h avec un traitement de I2 pendant 24h, ce nombre est significativement plus élevé, indiquant ainsi que la croissance du parasite est ralentie et non totalement inhibée (Figure 7A). Lors des comptages nous avons observé des nombres impairs de parasites ou qui ne sont pas un multiple de l'endodyogénie soulignant une altération de la croissance du parasite en présence d'I2. Dans une dernière série d'expériences, nous avons remarqué que lorsque l'exposition au composé I2 est supprimée, en changeant le milieu, les parasites reprennent leur croissance normalement et rapidement (Figure 7B).

L'ensemble de ces résultats suggère que I2 ne tue pas le parasite mais provoque un retard de la croissance. Nous avons estimé que sur 24h, le parasite, en présence du composé I2, a un retard

de deux cycles de division. Ce retard de croissance a été observé quel que soit la souche étudiée et avec le même décalage de deux cycles. Enfin, l'effet de I2 est réversible indiquant que ce composé à une action très rapide sur la croissance de *T. gondii*.

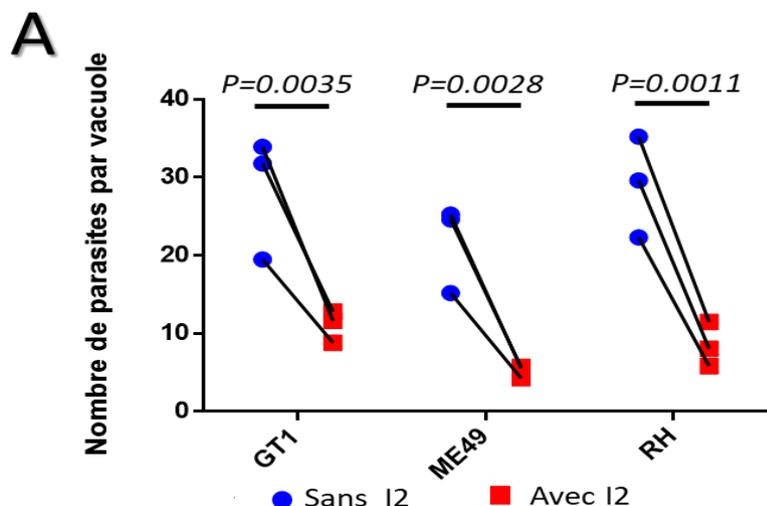
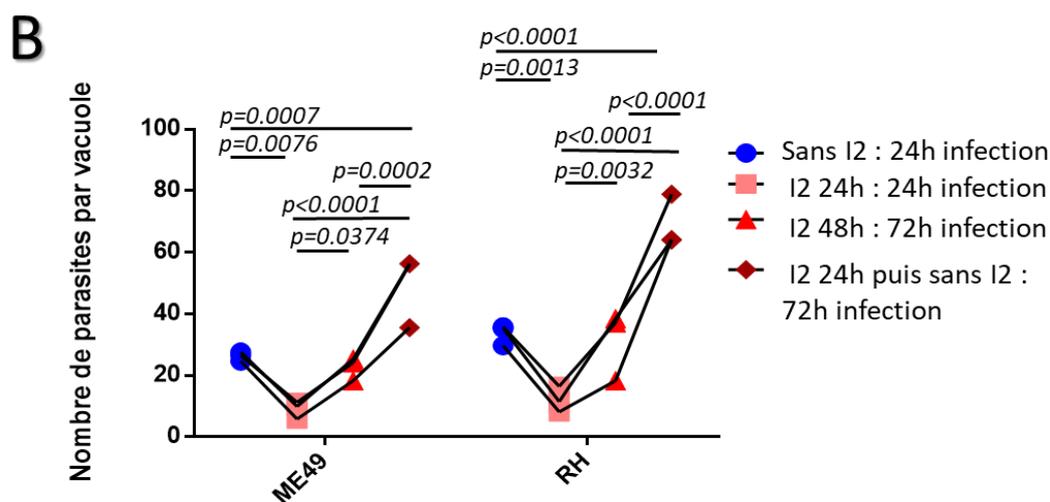


Figure 7 : Comptage du nombre de parasites par vacuole. Figure 7A : Graphique représentant le nombre de parasites présent dans chaque vacuole. Chaque point représente la moyenne d'une expérience, 10 champs sont comptés pour chaque condition. Figure 7B : Graphique représentant le nombre de parasites présent dans chaque vacuole. Chaque point représente la moyenne d'une expérience, 10 champs sont comptés pour chaque condition.



4. Phénotype vacuole souche dépendant

Au cours des expériences nous avons remarqué que sous exposition à la drogue I2 certaines souches développent un phénotype particulier. En effet les souches, ME49 ainsi que toutes les souches de types II et la RH de type I, montrent une déformation de la vacuole qui a l'apparence d'une bulle (Figure 8A). Pour cette raison ce phénotype est appelé « bubble ». Nous avons constaté que ce phénotype n'est pas présent chez certaines souches dont la GT1 et les souches GUY, qui présentent elles aussi, un défaut de croissance sous l'effet de I2 (Figure 8B). Bien que RH et GT1 soient toutes les deux des souches de types I, elles se différencient l'une de l'autre par l'expression

de certains gènes. La formation de ce phénotype « bubble », pourrait être associée à une régulation sur un gène précis exprimé différemment dans les souches de *T. gondii*.

Il est important de noter qu'à ce stade de notre étude, nous observons deux phénotypes précis chez le parasite sous l'exposition de I2 : un premier effet qui se caractérise par un retard de la croissance de parasite toutes souches confondues, et un second effet qui est une distorsion de la vacuole et est souche-dépendante. Par la suite nous nous sommes concentrés sur l'étude de cette distorsion de la vacuole.

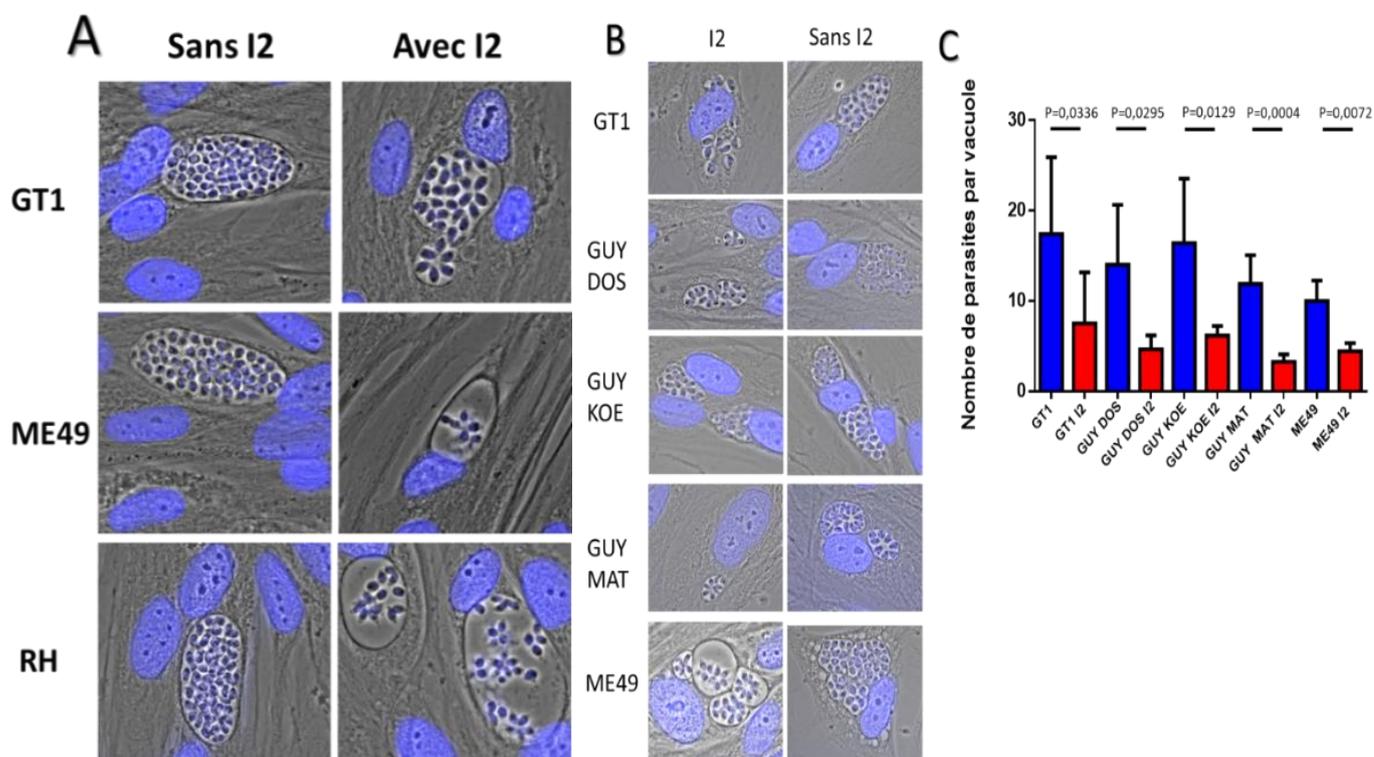


Figure 8 : Analyse des souches traitées par I2. Figure 8A : Image de microscopie des souches GT1, ME49 et RH avec ou sans traitement par le composé I2, les HFF sont fixées puis les noyaux marqués au HOESCHT. Figure 8B : Image de microscopie des souches GT1, GUY-DOS, GUY-KOE, GUY-MAT et ME49 avec ou sans traitement par le composé I2, les HFF sont fixées puis les noyaux marqués au HOESCHT. Figure 8C Comparaison du nombre de parasites par vacuole chez les souches GT1, GUY-DOS, GUY-KOE, GUY-MAT et ME49 traités ou non avec le composé I2.

Pour élucider la formation et l'apparition de « bubble », nous avons réalisé une cinétique et aussi plusieurs conditions de concentration de la drogue I2. Nous avons remarqué que ce phénomène arrive rapidement après ajout de la drogue car observable après 6h d'exposition et à une dose de 30µM, et à partir d'une dose de 20 µM pendant 24h le phénotype est aussi observable. Les vacuoles « bubbles » continuent à s'élargir si les temps d'incubation au composé I2 sont augmentés (Figure 9). Pour les expériences futures, les conditions retenues sont 24h d'exposition et 30µM du composé I2.

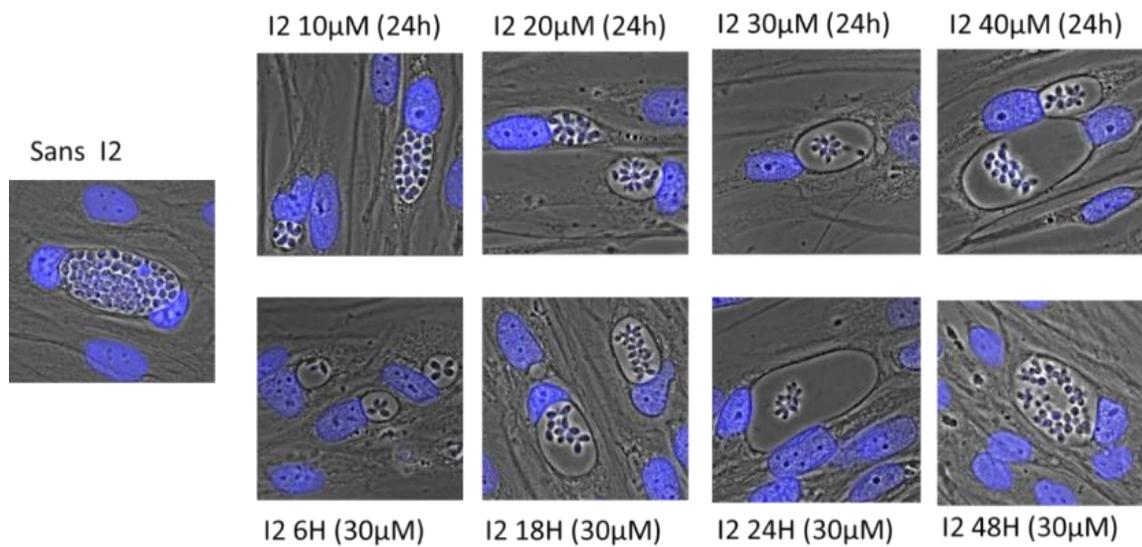


Figure 9 : Effet de la drogue I2 en fonction de sa concentration et de son temps d'incubation. Des HFF sont infectées par la souche PRU-ku80. La série du haut correspond au même temps d'incubation, 24h, mais à des doses différentes du composé I2. La série du bas correspond à la même concentration, 30µM, mais à des temps différents. Les cellules sont fixées puis marquées au HOESCHT

Nous avons recherché à savoir si ce phénomène était cellule- ou espèce- dépendante. Pour cela, le même type d'expérience a été réalisé sur des MEF (fibroblastes murins) les cellules Hela, une autre lignée humaine. Le phénotype vacuole « bubble » est observé dans ces deux types de cellules infectées par *T. gondii* en présence de la drogue I2 (Figure 10). Cette expérience indique que la déformation de la vacuole n'est pas régulée par l'espèce ou le type de cellule de l'hôte du parasite, et que la déformation de la vacuole est dérégulée par la drogue et par un effet direct sur l'expression d'un ou plusieurs gènes du parasite.

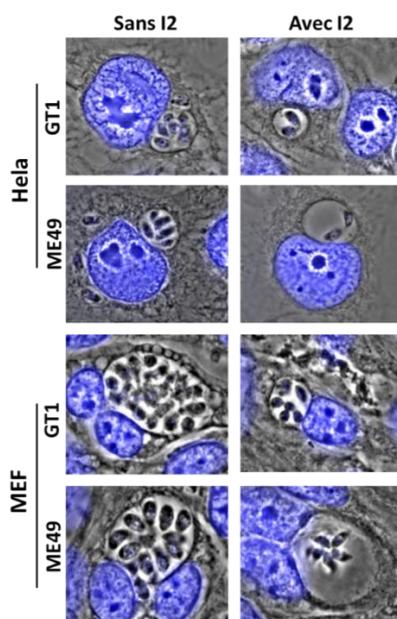


Figure 10 : Analyse de l'effet du composé I2 sur d'autres lignées cellulaires infectées par *T.gondii*. Des cellules Hela et MEF sont infectées par la souche PRU-ku80 pendant 24h puis traitées avec le composé I2 pendant 24h. Les cellules sont par la suite fixées et marquées au HOESCHT.

Brièvement, l'analyse des résultats obtenus permet de dresser le constat que le phénotype de limitation de la croissance est présent chez toutes les souches que nous avons étudiées à ce jour et comme le phénotype vacuole « bubble » n'est pas toujours observé et semble dépendre de la souche étudiée (Figure 11A), nous avons émis l'hypothèse que les deux phénotypes observés ne pas sont associés. Les mêmes séries d'expériences de cinétiques entreprises pour caractériser le défaut de croissance ont été réalisées pour détailler le phénotype vacuole « bubble ». Les résultats de ces expériences montrent que si on change le milieu et que les parasites ne sont plus sous effet de I2, la croissance du parasite reprend, comme précisé précédemment, et que le phénotype vacuole « bubble » n'est plus observé indiquant que ce phénotype est lui aussi réversible (Figure 11B). Ces expériences permettent d'avancer l'hypothèse que la drogue agit de manière franche et spontanée sur la croissance du parasite et n'induit pas de modification ni de changement irréversible du cycle de croissance du parasite et de la formation de la vacuole.

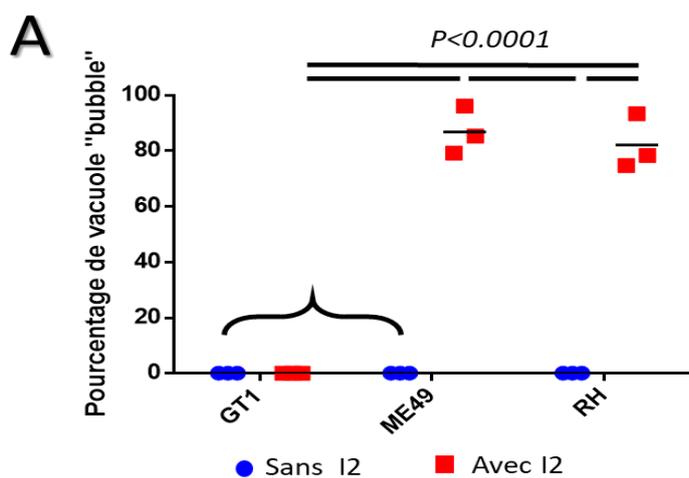
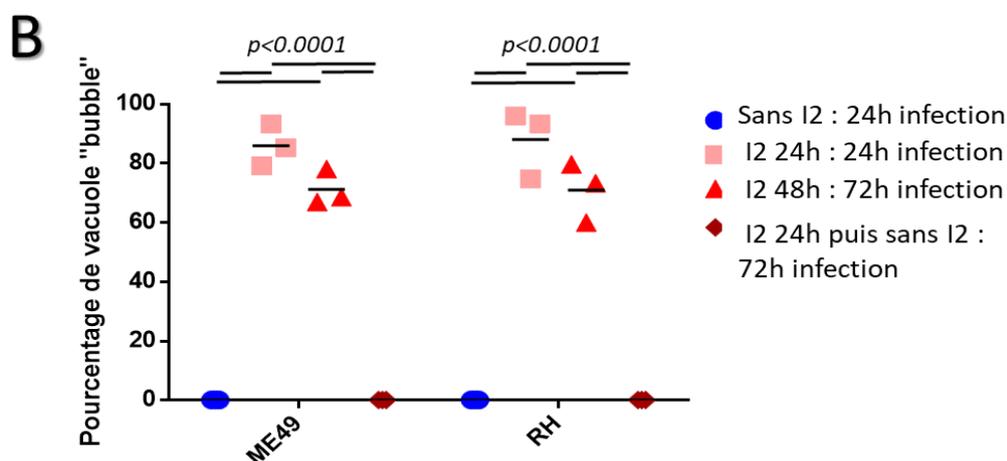
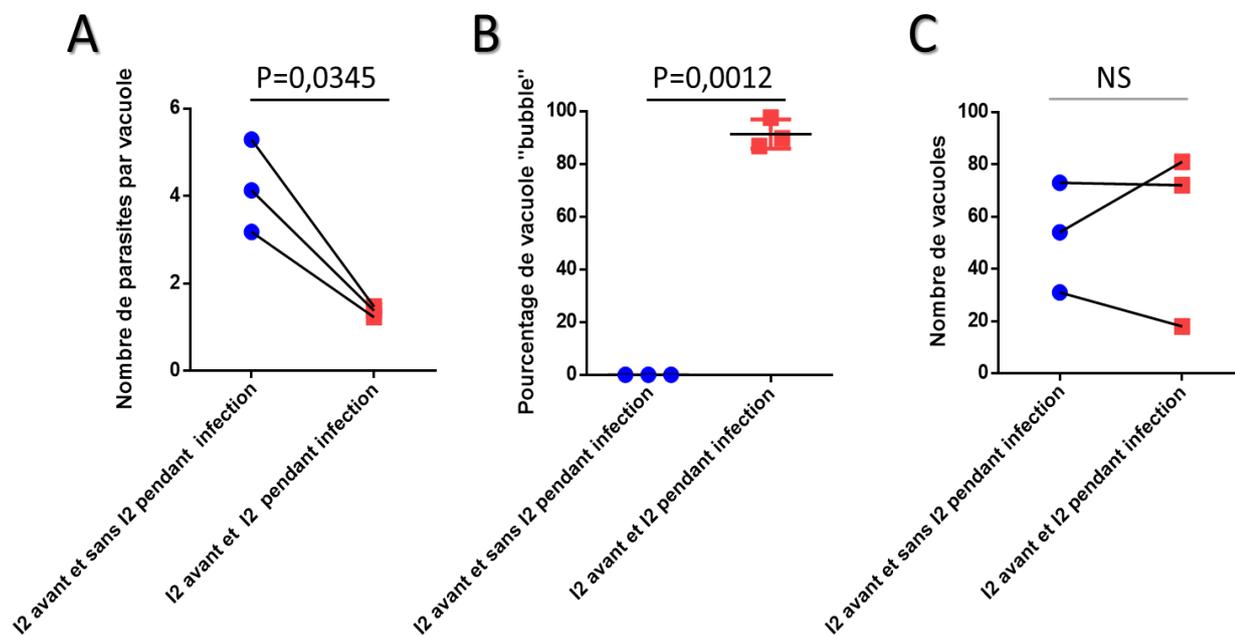


Figure 11 Phénotype « bubble » vacuole. Figure 21A : Pourcentage de vacuole « bubble » rapporté au nombre de vacuoles total chez les souches GT1, ME49 et RH traitées ou non avec le composé I2. Les cellules sont infectées pendant 24h et exposées à la drogue pendant 24h. Chaque point représente la moyenne d'une expérience. Figure 11B : Pourcentage de vacuole « bubble » rapporté au nombre de vacuoles total chez les souches GT1, ME49 et RH traitées ou non avec le composé I2, dans le temps. Chaque point représente la moyenne d'une expérience.



Pour poursuivre la caractérisation des effets du composé I2 sur le cycle de vie de *T. gondii* nous avons entrepris une série d'expériences dans les conditions où les cellules sont traitées avec la drogue avant d'être infectées par le parasite. Dans ces expériences, les cellules sont incubées préalablement pendant 24h avec le composé I2 puis les parasites sont ajoutés pendant 24h et toujours en présence de I2. Dans ces conditions de prétraitement avant infection, nous avons remarqué que les parasites infectent toujours la cellule hôte, et qu'ils forment une vacuole plus grande du type « bubble » (Figure 12B et Figure 12D). De plus, nous avons observé que les parasites ne se divisent pas ou très peu car nous avons dénombré une moyenne d'un parasite par vacuole contre quatre parasites par vacuole dans les cellules infectées et non prétraitées avec la drogue I2 (Figure 12A). Ces expériences nous montrent que I2 n'interfère pas avec la cellule hôte mais uniquement avec le parasite. Par ailleurs cette série d'expériences nous informe que I2 ne bloque pas l'invasion du parasite (Figure 12C), et qu'il est probable que la cible de I2 n'est pas un élément moléculaire de surface des différentes organelles du parasite et ni une protéine responsable de la phase d'invasion du parasite. Le composé I2 apparaît comme interférer avec la machinerie des gènes impliqués dans la réplication et la survie du parasite.



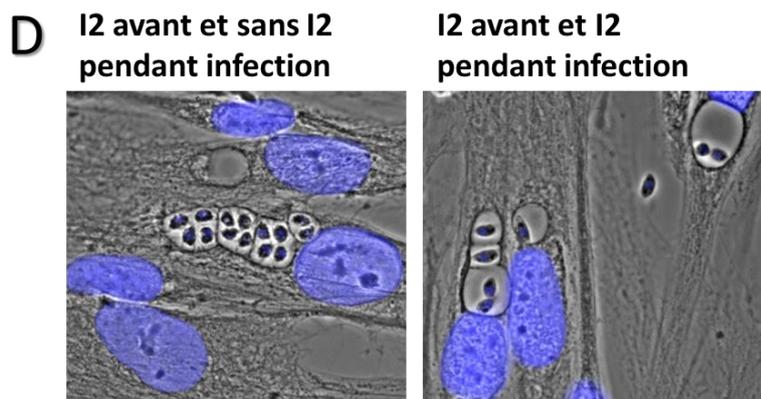


Figure 12 : Analyse des cellules prétraitées avec le composé I2, avant infection. Figure 12A Nombre de parasites par vacuole lors de pré-traitement des cellules HFF par I2. Chaque point représente la moyenne d'une expérience. Figure 12B Pourcentage de vacuoles « bubble » par rapport au nombre de vacuoles total. Chaque point représente la moyenne d'une expérience. Figure 12C nombre de vacuoles dans les 10 champs comptés par expériences. Chaque point représente la moyenne d'une expérience. Figure 12D Image de microscopie de cellules HFF traitées avec I2 pendant 24h puis infectées par PRU-ku80 avec ou sans présence de I2. Les cellules ont été fixées puis marquées au HOESCHT.

5. I2 n'induit pas l'expression de ENO1

Nous avons recherché à savoir si la drogue I2 pouvait induire le stade bradyzoïte du parasite, lié au fait qu'il est connu que le stade bradyzoïte à une croissance plus lente que le stade tachyzoïte. Vu les propriétés inhibiteur HDAC de la drogue I2, il est possible, que comme pour la drogue FR235222, le composé I2 soit lui aussi capable d'induire une interconversion des stades du parasites. Pour documenter cette hypothèse, nous avons utilisé une souche épitope étiquetée pour le gène *ENO1*, nommé : Pruku80-ENO1-HA-flag, puisque le gène *ENO1* est un gène spécifique du stade bradyzoïte. Des HFFs ont été infectées avec la souche Pru ku80-ENO1-HA-flag puis traitées indépendamment avec les drogues I2 et FR235222, qui dans le contexte de ces expériences, a été utilisé comme contrôle positif (FR235222 induisant ENO1, Sindikubwabo F *et al.*, 2017), pendant 18h puis les cellules infectées ont été fixées et marquées par immunofluorescence avec un anticorps primaire anti-HA qui est dirigé contre l'épitope du tag. On constate que, dans le cas où les parasites sont traités avec FR235222, plus de 90% des parasites expriment la protéine ENO1 dans le noyau du parasite. Par contre dans le cas des parasites traités avec la drogue I2, seulement 12% des parasites expriment ENO1 (Figure 13). Ces expériences ont été répétées plusieurs fois et les mêmes résultats ont été observés. De ce fait on en a déduit que la drogue I2 à l'opposé de FR235222 induit mal le stade bradyzoïte *in vitro*, bien qu'il soit décrit comme un HDAC inhibiteur.

aires des vacuoles de parasites non traités. Nous avons observé deux phénomènes, d'une part dans le cas d'un traitement de 6h, les aires des vacuoles des parasites traités ne sont pas significativement supérieures aux aires des vacuoles des parasites non traités, même si une tendance est observée (Figure 14A). D'autre part, dans le cas d'un traitement pendant 24h, les aires des vacuoles des parasites sous traitement d'I2 sont significativement inférieures aux aires des vacuoles des parasites non traités (Figure 14B). La combinaison de ces deux résultats nous indique que l'évolution de l'aire de la vacuole des parasites traitées ne coïncide pas avec l'évolution de la vacuole dans des conditions normales, démontrant ainsi que la distorsion de la vacuole est un phénomène proprement induit par la drogue I2 et indépendant du nombre de parasites. Nous avons remarqué que suite à des traitements sous exposition d'I2, pendant des temps inférieurs à 6h, l'aire de la vacuole semble être supérieure à celle de la vacuole contrôle et que malgré la distorsion observée, la vacuole sur le long terme n'atteindra pas la même taille que celle des vacuoles présentes dans des conditions normales.

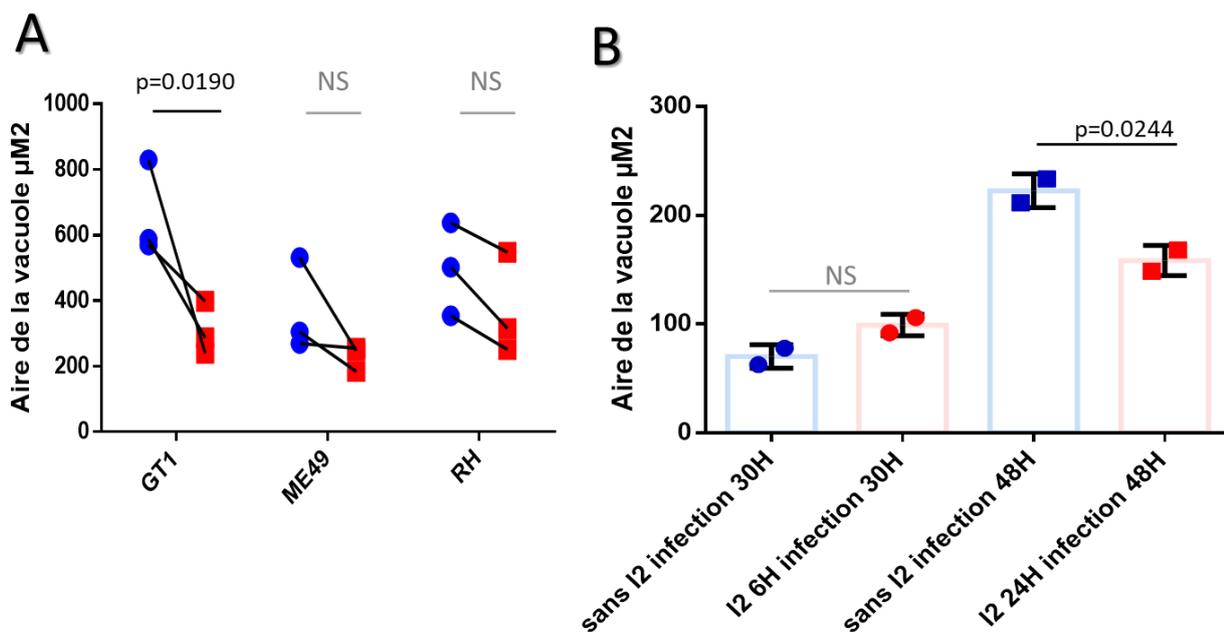
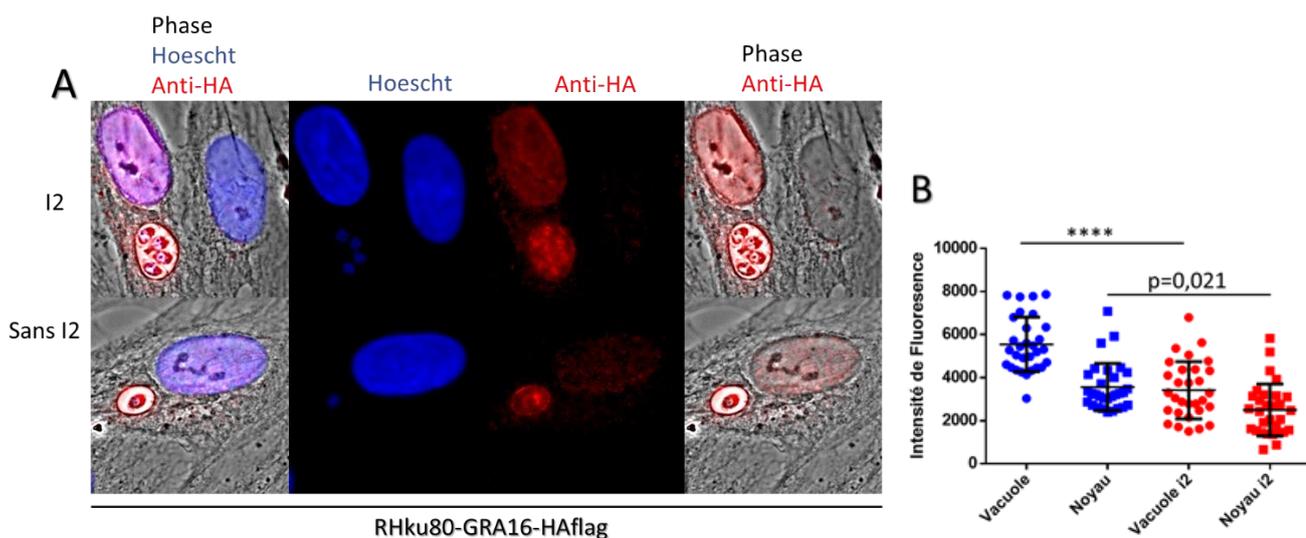


Figure 14 Analyse de l'aire de la vacuole. Figure 14A L'Aire de la vacuole est calculée à l'aide du logiciel Zen. Les souches GT1, ME49 et RH sont traitées ou non avec le composé I2. Figure 14B Aire de la vacuole des parasites traités ou non avec I2 en fonction de deux temps soit une incubation de 6h de I2 soit une incubation de 24h de I2.

7. Etude de l'impact de I2 sur les protéines des denses granules

Pour compléter cette étude nous nous sommes interrogés sur l'impact de cette distorsion de la vacuole sur les protéines des denses granules. Les protéines des denses granules peuvent être associés à la membrane de la vacuole parasitophore (MVP) ou impliquées dans des échanges par l'intermédiaire de la VP. Par le fait que la VP se voit modifiée par le composé I2, nous avons voulu vérifier si cette modification pouvait impacter sur les protéines des denses granules, comme un éventuel changement de localisation ou d'exportation des protéines. Dans un premier temps nous nous sommes intéressés aux protéines exportées au-delà de la vacuole, de manière à savoir si la vacuole garde sa perméabilité.

Nous avons utilisé deux souches identifiant deux différentes protéines exportées jusqu'au noyau, *RHku80-GRA16-HAflag* et *Pruku80-TGIST-HAflag*. Dans ces expériences les cellules sont infectées pendant 10 heures avant d'ajouter la drogue pendant 24h. Nous nous sommes placés dans ces conditions à cause de la cinétique de sécrétions des GRA qui est limitée dans le temps. Les cellules sont fixées puis marquées par immunofluorescence avec un anti-HA, l'intensité de fluorescence de chaque vacuole et du noyau des cellules infectées sont quantifiés. On observe qu'en présence de I2 l'intensité de fluorescence est significativement plus faible que ce soit dans la vacuole ou dans le noyau par rapport aux conditions sans I2, pour les deux souches testées (Figure 15). Toutefois on ne peut pas conclure si cette baisse d'intensité qui reflète une diminution de protéines est à accorder à en effet direct du composé I2 sur la perméabilité de la vacuole ou tout simplement, est une conséquence du défaut de croissance du parasite, et le reflet d'un effet secondaire.



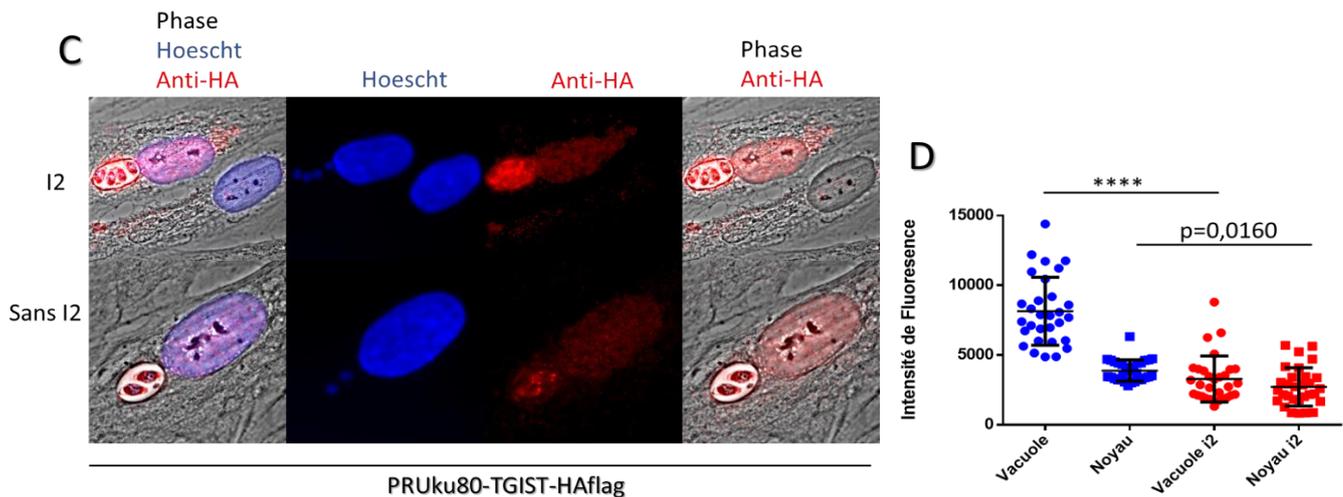


Figure 15 Etude de l'impact de I2 sur les GRA sécrétées. **Figure 15A** : Image de microscopie en fluorescence des marquages réalisés dans des cellules HFF infectées par la souche RH-ku80-GRA16-HAflag traitées ou pas avec I2 pendant 24h. Les cellules sont fixées puis marquées avec l'anticorps primaire anti-HA, et l'anticorps secondaire couplé à l'ALEXA 594. Les noyaux sont marqués au HOESCHT. **Figure 15B** Mesure de l'intensité de fluorescence des vacuoles et des noyaux des cellules infectées par la souche RH-ku80-GRA16-HAflag. L'intensité a été calculée grâce au logiciel Zen. **Figure 15C** : Image des marquages réalisés en fluorescence dans des cellules HFF infectées par la souche PRU-ku80-TGIST-HAflag traitées ou pas avec I2 pendant 24h. Les cellules sont fixées puis marquées avec l'anticorps primaire anti-HA, et l'anticorps secondaire couplé à l'ALEXA 594. Les noyaux sont marqués au HOESCHT. **Figure 15D** Mesure de l'intensité de fluorescence des vacuoles et des noyaux des cellules infectées par la souche PRU-ku80-TGIST-HAflag. L'intensité a été calculée grâce au logiciel Zen. **** est égale à une p value de $\leq 0,0001$

Afin de répondre à ces deux hypothèses, une seconde série d'expériences a été réalisée en incluant un contrôle supplémentaire. Les cellules ont été infectées avec les parasites pendant 6 heures et au moment de rajouter la drogue I2, une série de cellules sans drogue est fixée. La drogue I2 est rajoutée pendant 24h et un contrôle sans drogue est inclus. De cette manière nous avons un point pour quantifier les protéines avant l'action de la drogue et établir des comparaisons avec les parasites traités et non traités dans un temps plus long. Avec les deux souches étudiées, nous avons constaté qu'au point 6h sans traitement il y a peu de protéines, et noté, par comparaison, au point 24h, une augmentation de l'intensité de fluorescence que ce soit avec ou sans traitement (Figure 16). Cependant, l'intensité de fluorescence et par conséquent la quantité de protéines, entre les parasites traités ou non, sur le long terme, est significativement différente. En d'autres termes ces expériences montrent que les protéines continuent à être exportées sous l'action de la drogue I2, que la diminution de la quantité de protéine est en rapport avec le nombre de parasites par vacuole.

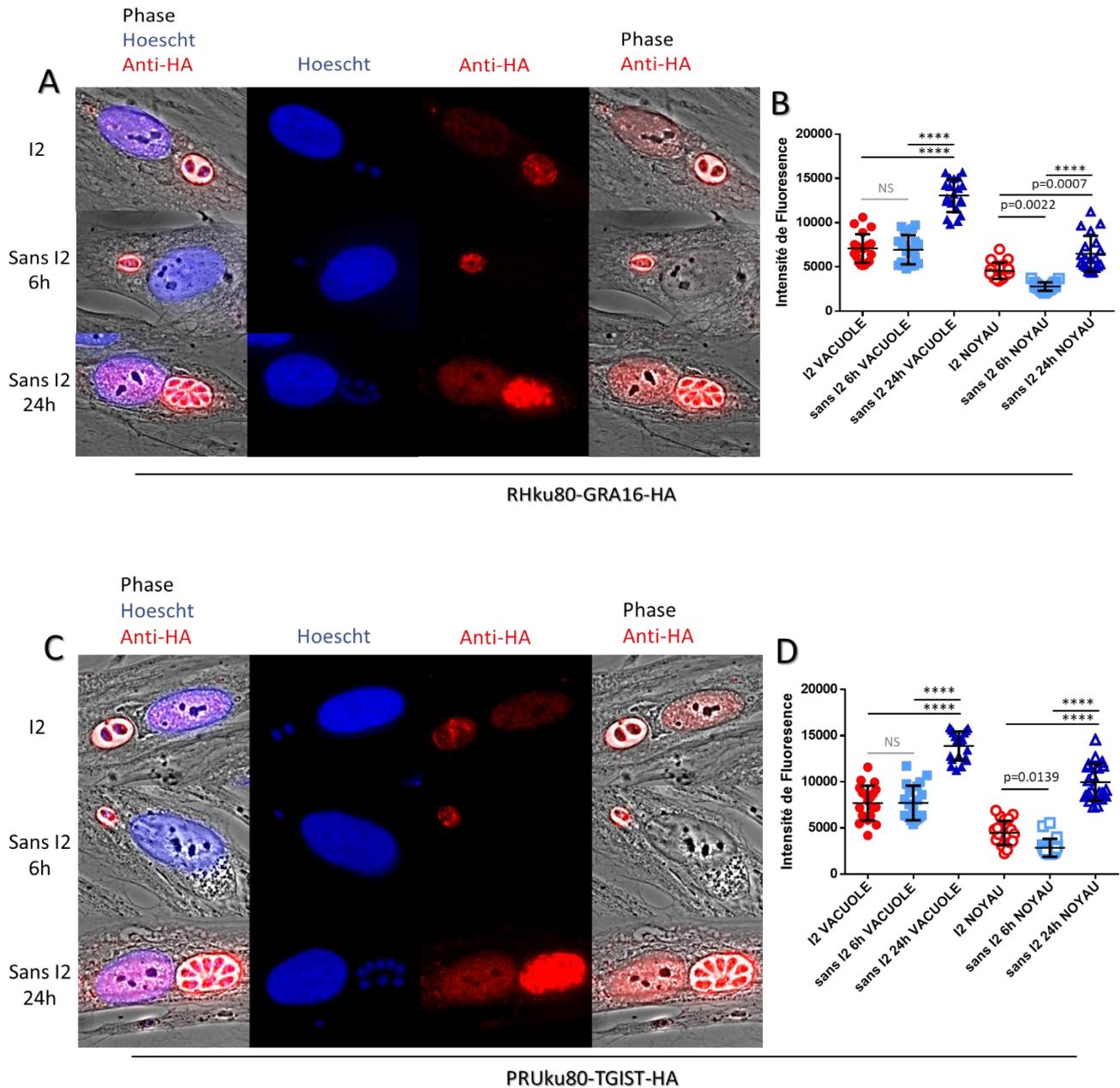


Figure 16 Etude de l'impact de I2 sur les GRA sécrétées dans le temps. **Figure 16A** : Image des marquages réalisés en fluorescence dans des cellules HFF infectées par la souche RH-ku80-GRA16-HAflag traitées ou pas avec I2 pendant 18h. Avec deux points de contrôle de cellules non traitées : un point à 6h d'infection avant que la drogue soit ajoutée et un point à 24h. Les cellules sont fixées puis marquées avec l'anticorps primaire anti-HA, et l'anticorps secondaire couplé à l'ALEXA 594. Les noyaux sont marqués au HOESCHT. **Figure 16B** Mesure de l'intensité de fluorescence des vacuoles et des noyaux des cellules infectées par la souche RH-ku80-GRA16-HAflag. L'intensité a été calculée grâce au logiciel Zen. **Figure 16C** : Image des marquages réalisés en fluorescence dans des cellules HFF infectées par la souche PRU-ku80-TGIST-HAflag traitées ou pas avec I2 pendant 18h. Avec deux points de contrôle de cellules non traitées : un point à 6h d'infection avant que la drogue soit ajoutée et un point à 24h. Les cellules sont fixées puis marquées avec l'anticorps primaire anti-HA, et l'anticorps secondaire couplé à l'ALEXA 594. Les noyaux sont marqués au HOESCHT. **Figure 16D** Mesure de l'intensité de fluorescence des vacuoles et des noyaux des cellules infectées par la souche PRU-ku80-TGIST-HAflag. L'intensité a été calculée grâce au logiciel Zen. **** est égale à une p value de $\leq 0,0001$.

Ces expériences indiquent que les parasites ne se convertissent pas vers un stade cystique bradyzoïte, car il a été récemment démontré que les parasites bradyzoïtes présents dans un kyste

peuvent produire des GRA mais ces dernières ne sont plus exportées au-delà de la vacuole (Krishnamurthy S et Saeij JPJ, 2018).

Nous avons poursuivi notre analyse en nous focalisant sur GRA17 et GRA23. Selon une récente étude la délétion de GRA17 chez *T. gondii* engendre le même type de distorsion de la vacuole que celui observé avec le composé I2. Ces deux protéines GRA17 et GRA23 travaillent ensemble pour apporter des nutriments aux parasites et sont des marqueurs de la MVP (Gold DA et al, 2015). Ces deux GRA protéines possèdent un homologue chez *Plasmodium*. Aussi, il nous est apparu pertinent de regarder si ce composé I2 altérerait les fonctions de GRA17. Les souches RHku80- Δ GRA17, RHku80-GRA17-HA, RHku80-GRA23-HA et la souche Wild-Type (WT) sont utilisées et proviennent du laboratoire de Jeroen Saeij (UC Davis, Californie). Il est à noter que la souche RHku80- Δ GRA17 a un léger retard de croissance par rapport à celle des autres souches. Le même type d'expérience que pour les études de GRA16 et TgIST ont été réalisées incluant une mesure à 6h avant l'addition de la drogue I2 comme point de comparaison. Les cellules HFFs ont été infectées avec les différentes souches de parasites puis traitées, fixées et marquées par immunofluorescence avec un anti-HA. Comme attendu les souches WT et RHku80- Δ GRA17 ne présentent aucun marquage, car ces souches ne possèdent pas de HAFlag, elles servent de contrôle négatif. De manière surprenante, nous avons constaté que le composé I2 n'affecte pas la sécrétion de GRA17 ni celle de GRA23 car l'intensité de fluorescence est significativement plus élevée chez les parasites traités que chez les parasites non traités avec une infection de 6h (Figure 17). Ceci démontre que GRA17 et GRA23 continuent d'être sécrétées en présence d'I2. Par contre l'intensité de fluorescence est significativement plus faible chez les parasites traités que non traités avec une infection de 24h, et ceci serait due au nombre plus faible de parasite dans la vacuole. Il est à noter que nous n'observons pas modification de la localisation de la protéine que ce soit pour GRA17 et GRA23. Si la délétion de GRA17 et l'exposition de I2 ont pour conséquence le partage en commun d'un même phénotype, la distorsion de la vacuole par I2 ne semble pas être due à une dérégulation de GRA17 par I2. Les mécanismes moléculaires impliqués, par la délétion de GRA17 dans la distorsion de la vacuole ne sont pas connus. On peut toutefois penser que le parasite met en place un « mécanisme de compensation ». Les composants moléculaires de ce mécanisme pourraient être partagés totalement ou en parti et conduire au phénotype de distorsion de la vacuole observée soit par délétion de GRA17 ou soit par traitement avec le produit I2.

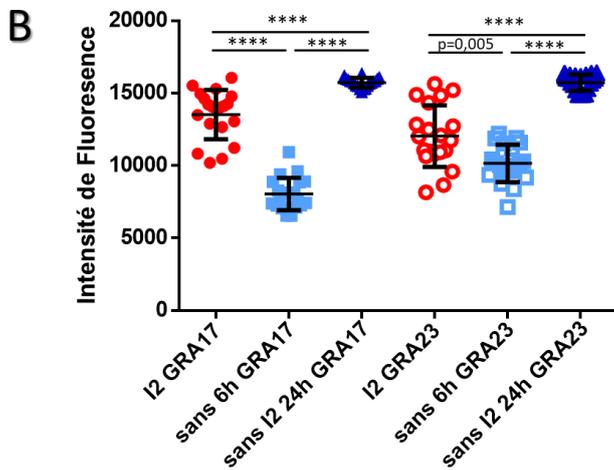
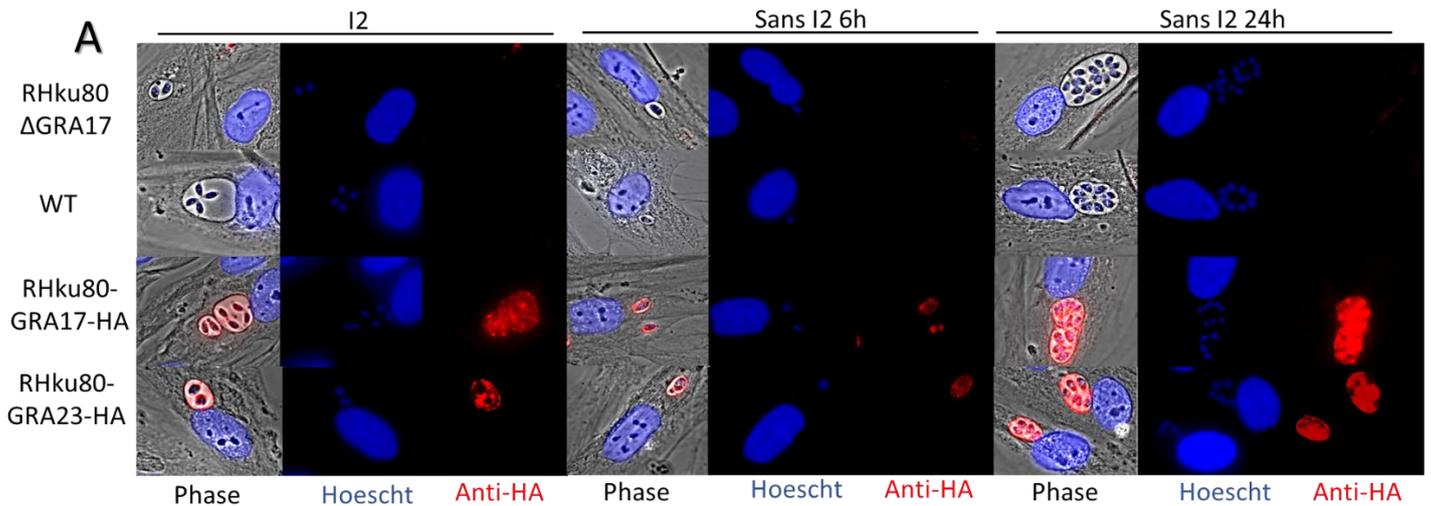


Figure 17 : Etude du composé I2 sur GRA17 et GRA23. Figure 17A : Image de microscopie en fluorescence des marquages réalisés dans des cellules HFF infectées par les souches RH-ku80-GRA17-HA, RH-ku80-GRA17-HAflag, RH-ku80-ΔGRA17 et WT traitées ou pas avec I2 pendant 18h. Deux points de contrôle sont inclus : un point à 6h d'infection avant que la drogue soit ajoutée et un point à 24h sans drogue. Les cellules sont fixées puis marquées avec l'anticorps primaire anti-HA, et l'anticorps secondaire couplé à l'ALEXA 594. Les noyaux marqués au HOESCHT. Figure 17B Mesure de l'intensité de fluorescence des vacuoles des souches RH-ku80-GRA17-HA, RH-ku80-GRA17-HAflag. L'intensité a été calculée grâce au logiciel Zen. **** est égale à une p value de $\leq 0,0001$

Afin de continuer les investigations sur le composé I2 sur les denses granules, nous avons regardé si la distorsion de la vacuole avait un impact sur deux autres GRA, GRA1 et GRA7. Ces deux GRA ont des fonctions sur la vacuole que ce soit sur les liaisons calciques ou sur le réseau tubulaire. Dans les expériences suivantes nous avons utilisés des HFF infectées avec les souches PRUku80 ou GT1 pendant 6H ou 24H, puis le composé I2 a été ajouté dans le milieu durant 24h. Les cellules ont été fixées et marquées en immunofluorescence par un anticorps anti-GRA1 ou anti-GRA7. Nous avons observé une diminution de l'intensité de marquage voire une absence du marquage de GRA1 chez la souche PRUku80 traitée avec I2 contrairement à la souche GT1 où aucune différence d'intensité par rapport au contrôle est observée (Figure 18A/B/C/D). En d'autres

termes, chez la souche formant le phénotype vacuole « bubble », on observe une perte d'expression de GRA1 sous traitement I2, et cette perte d'expression n'est pas notée chez les souches ne formant pas le phénotype vacuole « bubble ». Cette perte significative d'intensité de fluorescence est retrouvée que ce soit à des temps courts ou longs d'infection chez les parasites traités. En parallèle, une série d'expériences a été réalisée sur des cellules Hela, montrant également une perte d'intensité de marquage de GRA1 chez les parasites traités et présentant la distorsion de la vacuole. Cette perte de signal de GRA1 reste surprenante car GRA1 est une protéine essentielle pour la survie du parasite. La perte du signal pourrait être due, non à une altération de GRA1 mais à un problème de reconnaissance de la protéine par l'anticorps. En effet la formation de la vacuole ou l'effet de I2 pourrait changer la conformité de la protéine et empêcher la reconnaissance par l'anticorps. Afin de confirmer ce résultats plusieurs possibilités d'expériences sont possible, soit l'utilisation d'un anticorps polyclonal qui présente l'avantage de reconnaître plusieurs sites de reconnaissances, soit réaliser un épitope tagging afin de suivre la protéine et identifier le tag qui lui à moins de chance d'être altéré et soit un western blot, cette technique est obligatoire pour pouvoir mesurer réellement la perte de GRA1.

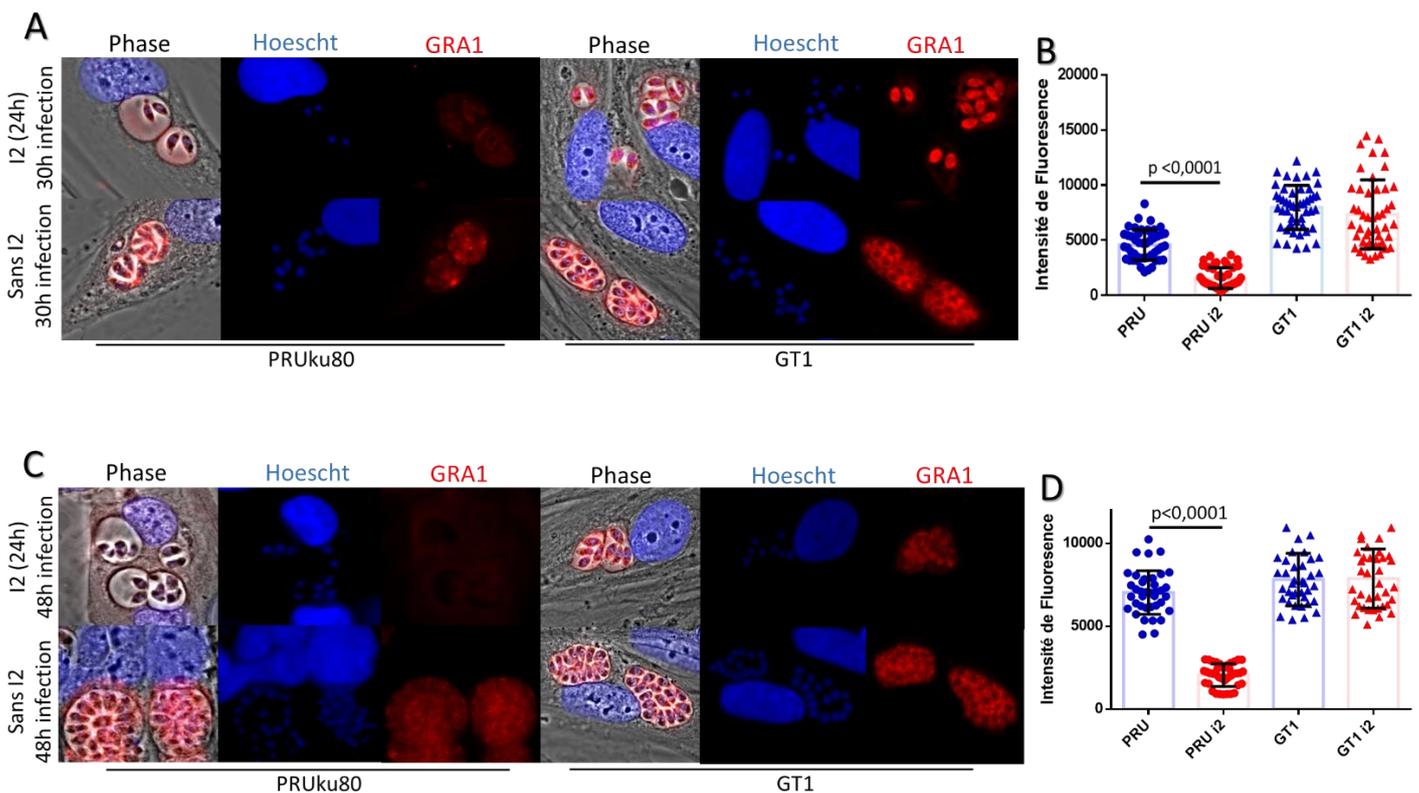


Figure 18 : Analyse du composé I2 sur GRA1. Figure 18A : Image de Microscopie en fluorescence des marquages réalisés dans des cellules HFF infectées par les souches GT1 et ME49 pendant 6h, traitées ou pas avec I2 pendant 24h. Les cellules sont fixées

puis marquées avec l'anticorps primaire anti-*GRA1*, et l'anticorps secondaire couplé à l'*ALEXA 594*. Les noyaux sont marqués au *HOESCHT*. Figure 18B Mesure de l'intensité de fluorescence des vacuoles des souches *GT1* et *ME49*. L'intensité a été calculée grâce au logiciel *Zen*. Figure 18C : Image de Microscopie en fluorescence des marquages réalisés dans des cellules *HFF* infectées par les souches *GT1* et *ME49* pendant 24h, traitées ou pas avec *I2* pendant 24h. Les cellules sont fixées puis marquées avec l'anticorps primaire anti-*GRA1*, et l'anticorps secondaire couplé à l'*ALEXA 594*. Les noyaux sont marqués au *HOESCHT*. Figure 18D Mesure de l'intensité de fluorescence des vacuoles des souches *GT1* et *ME49*. L'intensité a été calculée grâce au logiciel *Zen*.

En ce qui concerne *GRA7*, un changement de la localisation du marquage chez la souche *PRUku80* traités avec *I2* est observée alors qu'aucune modification n'est notée chez la souche *GT1* traité avec *I2*. Plus précisément, nous avons remarqué un marquage très précis de la MVP des « bubble » vacuole, en accord avec une perte de signal à l'intérieur de la vacuole (Figure 19 A/B). Ce changement de marquage est retrouvé à tous les temps étudiés pendant l'infection chez la souche *PRU-ku80*. Toutefois une légère baisse d'intensité de fluorescence est perceptible chez les parasites dont la période d'infection est plus longue avant le traitement par *I2* (Figure 18C/D). Ces expériences ont été reproduites sur des cellules *Hela* et les observations et les résultats sont identiques. Il paraît étrange que les protéines *GRA1* et *GRA7* soient toutes les deux impactées par le composé *I2*. L'hypothèse amorcée sur un problème de reconnaissance de la protéine est d'autant plus probable. Les mêmes expériences proposées pour *GRA1* devront être réalisées pour *GRA7*.

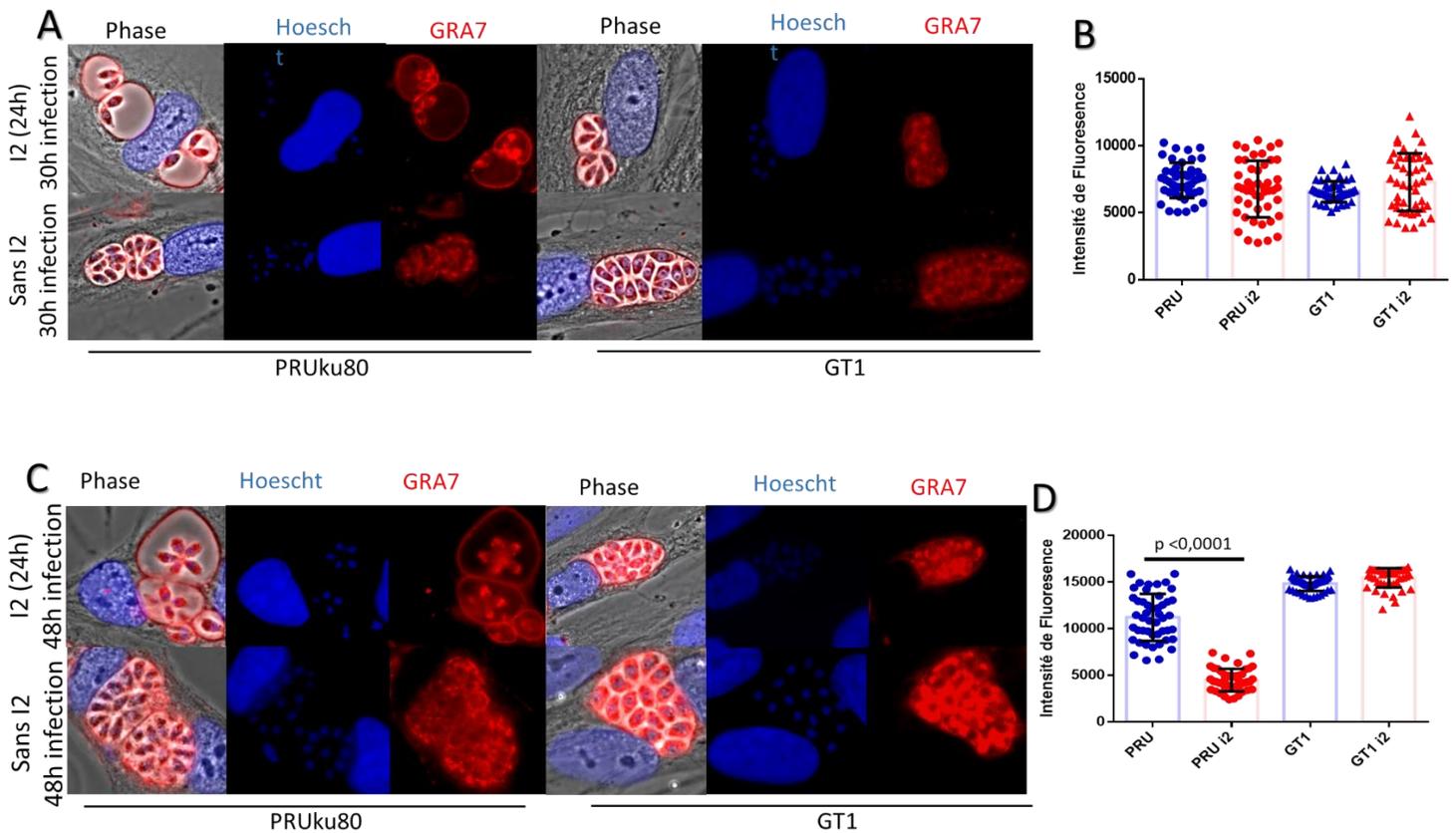


Figure 19 : Analyse du composé *I2* sur *GRA7*. Figure 18A : Image de microscopie en fluorescence des marquages réalisés dans des cellules *HFF* infectées pendant 6h par les souches *GT1* et *ME49*, traitées ou pas avec *I2* pendant 24h. Les cellules sont fixées puis marquées avec l'anticorps primaire anti-*GRA7*, et l'anticorps secondaire couplé à l'*ALEXA 594*. Les noyaux sont

marqués au HOESCHT. Figure 18B Mesure de l'intensité de fluorescence des vacuoles des souches GT1 et ME49. L'intensité a été calculée grâce au logiciel Zen. Figure 18C : Image de microscopie en fluorescence des marquages réalisés dans des cellules HFF infectées pendant 24h par les souches GT1 et ME49, traitées ou pas avec I2 pendant 24h. Les cellules sont fixées puis marquées avec l'anticorps primaire anti-GRA7, et l'anticorps secondaire couplé à l'ALEXA 594. Les noyaux sont marqués au HOESCHT Figure 18D Mesure de l'intensité de fluorescence des vacuoles des souches GT1 et ME49. L'intensité a été calculée grâce au logiciel Zen.

8. Etude de génétique inverse pour identifier le locus responsable dans le phénotype « bubble » médié par I2

L'exposition des parasites au composé I2 induit deux phénotypes principaux : le premier qui se résume en un retard de croissance et est souche indépendante et le second concerne la vacuole « bubble » et est souche dépendante. Compte tenu du fait que le phénotype « bubble » vacuole soit souche dépendante, il est probable que ce phénotype soit régulé par un gène qui n'est pas exprimé de manière identique dans toutes les souches. L'analyse de la descendance de parasites (progénies) issus d'un croisement entre la souche GT1 qui ne forme pas de vacuole et la souche ME49 qui forme une vacuole, nous a semblé une approche pertinente pour identifier la région ou le gène responsable du phénotype vacuole sous l'effet de I2. La descendance du croisement entre souches GT1 et ME49 a donné plusieurs souches de parasites qui ont un génome partagé entre les gènes parentaux GT1 et ME49 et ont des séquences de gènes identifiées comme appartenant soit à la souche parentale GT1 soit à la souche parentale ME49 (Benhke et al, 2011). Un mapping a été réalisé (selon la méthode décrite dans Boyle et al, 2008), sur cette descendance et chaque progénie après infection a été traitée avec I2 puis fixée et observée en microscopie enfin de déterminer si le phénotype vacuole était présent ou pas (Figure 20A). Chaque observation a été faite par 3 manipulateurs sans concertation et de manière indépendante. Pour chaque souche de progénie, le nombre de vacuoles présentant le phénotype « bubble » est compté, sur cinq champs différents et ceci est répété sur deux expériences, puis ce nombre est exprimé en pourcentage par rapport aux nombres de vacuoles totales, montrant ainsi la répartition du phénotype vacuole « bubble » selon les progénies. Le phénotype scoré est associé à chaque progénie et aux parentales, qui servent de témoin. Grâce à l'utilisation du logiciel, qui va établir une corrélation entre le phénotype et la séquence génique appartenant soit à GT1 soit à ME49, cela nous a permis l'identification d'une région génique sur le chromosome XII (Figure 20B). Toutefois cette correspondance entre le phénotype vacuole « bubble » et la région génique n'est pas de 100% (Figure 20C).

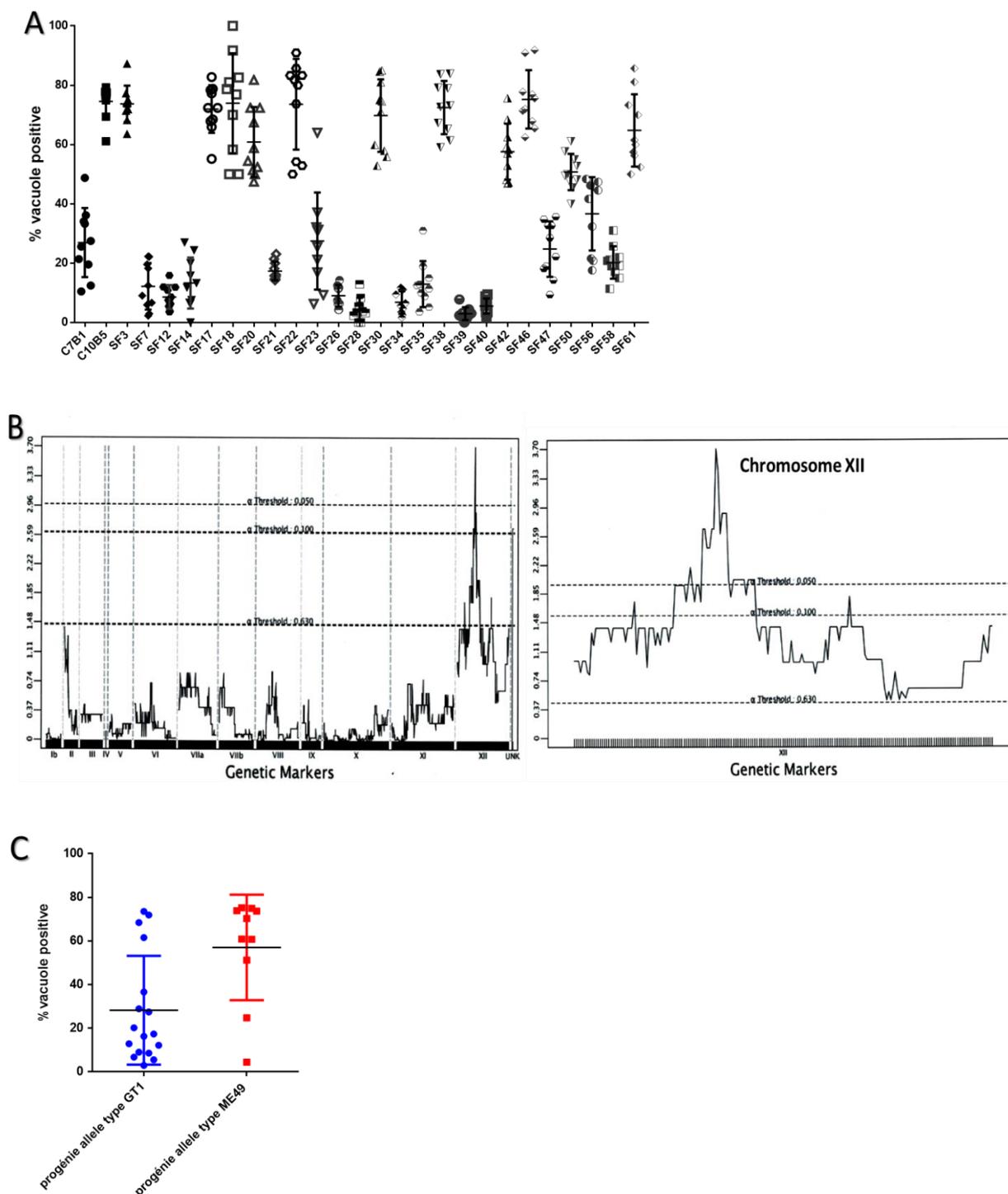


Figure 30 : Analyse QTL (quantitative trait loci). Figure 20A : Pourcentage de « bubble » vacuole exprimé par rapport au nombre de vacuoles total, pour chaque progénie. Figure 20B : Graphique d'analyse QTL par le logiciel X, les pics représentent des zones ou le mapping entre le phénotype « bubble » et une région génique corrèle fortement. Figure 20C : Pourcentage de « bubble » vacuole selon la région génique qui correspond à la souche GT1 ou ME49.

La région identifiée sur le chromosome XII, représente une quarantaine de gènes qui ont des fonctions très différents (Figure 21) (Tableau 1). Certains gènes qui présentent des propriétés intéressantes en lien avec les phénotypes observés, comme *TGME49-245530*, *TGME49-245550* et *TGME49-245570*, ont été sélectionnés dans une première approche.

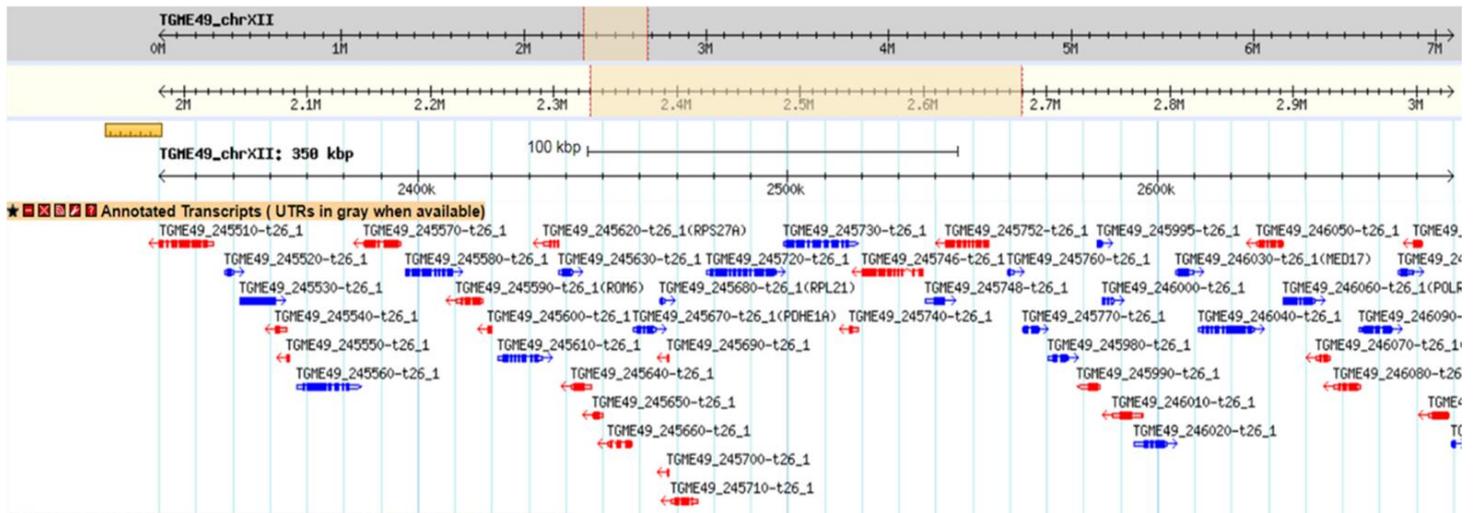


Figure 21 : Gène correspondant à la région génomique d'intérêt. Image montrant les gènes compris dans la région d'intérêt du phénotype « bubble »

Gene ID	Product Description	transcript length	Protein Length	Lourido_ CRISPR phenotype	Total SNPs	Nonsynonymous SNPs	Synonymous SNPs	TZ-mb (peptide NR)	RHOPTRY CLUSTER
TGME49_245510	calcium-transporting ATPase activity phospholipid-translocating P-type, flippase subfamily protein	8192	2427	-3,8	154	16	32	33	
TGME49_245520	hypothetical protein	1472	235	-2,8	17	0	4		
TGME49_245530	hypothetical protein	7578	2525	-0,5	57	26	13		
TGME49_245540	hypothetical protein	2626	161		34	4	1		
TGME49_245550	hypothetical protein	579	192	-0,3	3	2	1	1	Rhoptry_Cluster
TGME49_245560	hypothetical protein	6444	2147	-0,3	143	37	23		
TGME49_245570	origin recognition complex subunit 2 protein	2655	884	-5,2	142	8	13		
TGME49_245580	hypothetical protein	7008	2335	-4,0	148	27	26		
TGME49_245590	rhomboid protease ROM6	2595	588	-1,8	56	12	4		
TGME49_245600	hypothetical protein	1287	428	1,6	5	3	2		
TGME49_245610	hypothetical protein	2067	615	0,7	129	7	11	1	
TGME49_245620	ribosomal-ubiquitin protein RPS27A	1122	154	-4,6	31	0	0		
TGME49_245630	hypothetical protein	1848	73	-2,5	31	0	0		
TGME49_245640	hypothetical protein	2672	416	-0,3	33	3	2	1	Rhoptry_Cluster
TGME49_245650	hypothetical protein	558	185	-3,6	16	1	1		
TGME49_245660	hypothetical protein	3171	859	-2,6	43	5	5		
TGME49_245670	pyruvate dehydrogenase complex subunit PDH-E1Alpha	1908	635	0,2	34	6	7	21	
TGME49_245680	ribosomal protein RPL21	474	157	-3,6	4	0	4	7	
TGME49_245710	putative phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase	1466	273	1,2	53	0	0	1	
TGME49_245720	SWI2/SNF2-containing protein	9333	3110	-0,3	217	46	41	1	
TGME49_245730	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase	6435	2144	-1,9	222	27	40	4	

Tableau 1 : Les gènes compris dans la région génomique d'intérêt. Récapitulatif et descriptif des gènes qui sont compris dans la région génomique d'intérêt.

9. Etude des gènes.

Dans la région identifiée via la combinaison des résultats de mapping et de criblage, trois gènes : *TGME49-245530*, *TGME49-245550* et *TGME49-245570* ont retenu notre attention. Deux de ces gènes selon l'étude de Sebastian Lourido (Sidik et al, 2016) ne sont pas essentiels, car un score non hautement négatif leur a été attribué compris entre 0 et -1, contrairement à *TGME49-245570* qui lui semble essentiel (score : -5,2). Ces 3 gènes présentes des SNP (single nucléotide polymorphisme) entre les souches de *T. gondii*, et cela pourrait expliquer la différence du phénotype « bubble » vacuoles entre GT1 et ME49. Les KO de ces 3 gènes ont été générés par la méthode CRISPR-CAS9 pour la souche PRU-ku80. Les parasites issus des souches dont l'un des 3 gènes est KO, présentent des similitudes avec les parasites traités par I2, au niveau morphologique mais ne présentent pas le phénotype « bubble vacuole ». Malheureusement il n'a pas été possible de garder les parasites et de les stabiliser en lignées/souches, car tous parasites générés meurent trop rapidement. Par la suite les gènes *TGME49-245530* et *TGME49-245550* ont été tagués avec un HAFlag et/ou HAFlag-mcherry (uniquement pour le gène *TGME49-245530*) dans la souche PRU-ku80, afin de pouvoir localiser les protéines correspondant à ces gènes et de les suivre. L'objectif recherché est, qu'en fonction des résultats des marquages, de refaire des délétions de ces gènes dans des souches de parasites pour avoir une population stable. En ce qui concerne le gène *TGME49-245530*, nous avons remarqué qu'au temps court après infection, c'est-à-dire 4h et 6h, un marquage en forme de point à l'intérieur du parasite (Figure 22 A/B). Par contre à des temps plus longs, après infection de 24h et 48h, le marquage est plus diffus dans le parasite et ne forme plus de point (Figure 22 A/B). Pour le gène *TGME49-245550*, le marquage ne varie pas en fonction du temps, et est plus localisé vers les rhoptries (Figure 22C)

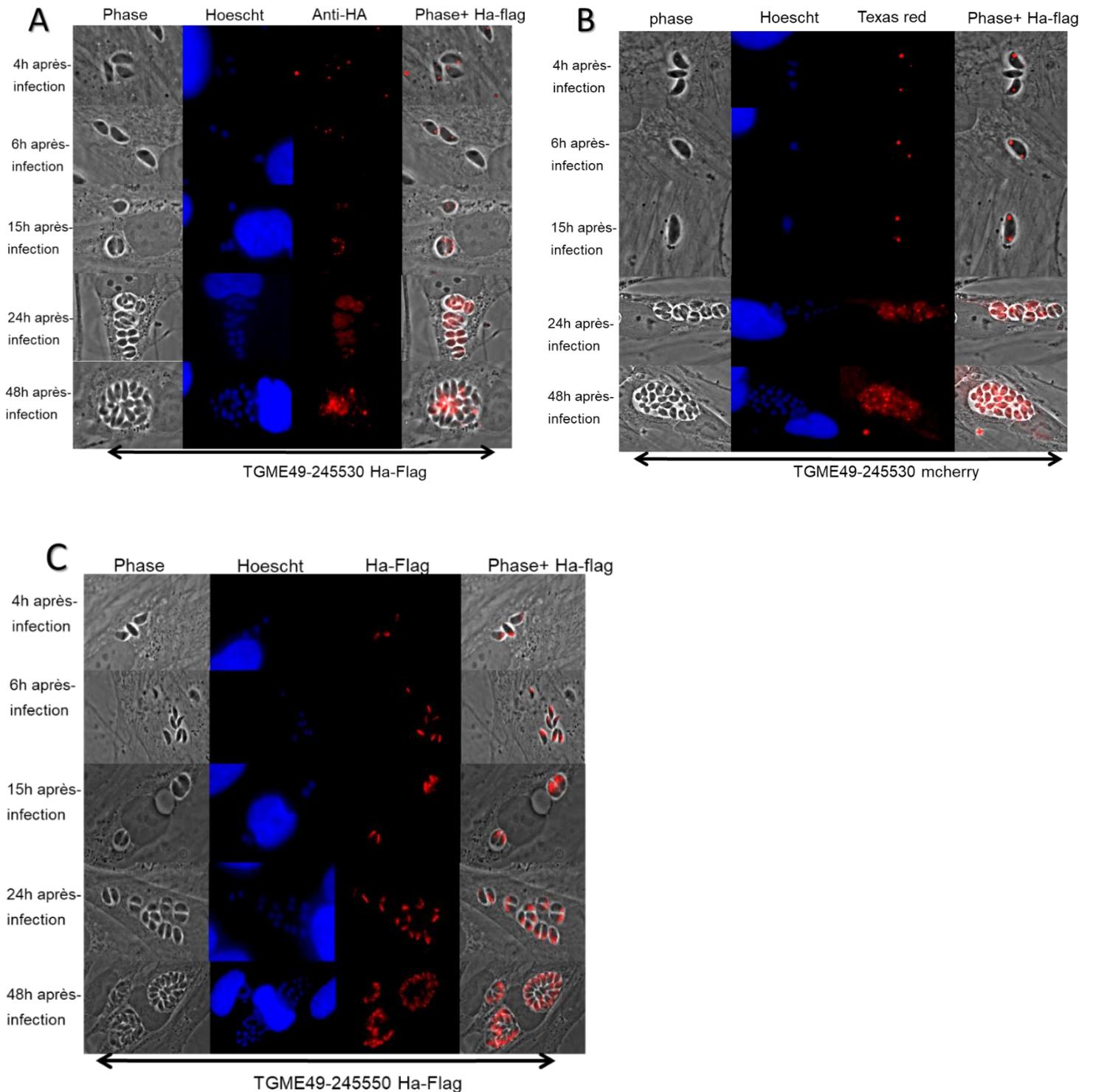


Figure 22 : Imagerie de microscopie en fluorescence des gènes TGME49-245530 et TGME49-245550. Figure 22A : Image de microscopie en fluorescence des marquages réalisés dans des cellules HFF infectées par la souche TGME49-245530-HAflag, au cours du temps. Les cellules sont fixées puis marquées avec l'anticorps primaire anti-HA, et l'anticorps secondaire couplé à l'ALEXA 594. Les noyaux sont marqués au HOESCHT. Figure 22B Image de microscopie en fluorescence des marquages réalisés dans des cellules HFF infectées par la souche TGME49-245530-mcherry, au cours du temps. Les cellules sont fixées. Les noyaux sont marqués au HOESCHT. Figure 22C Image de microscopie en fluorescence des marquages réalisés dans des cellules HFF infectées par la souche TGME49-245550-HAflag, au cours du temps. Les cellules sont fixées puis marquées avec l'anticorps primaire anti-HA, et l'anticorps secondaire couplé à l'ALEXA 594. Les noyaux sont marqués au HOESCHT.

Les parasites tagués pour les gènes *TGME49-245530* et *TGME49-245550* ont été traités avec I2 pendant 18h, 24h et 36h, après infection, afin de déterminer si ces gènes interagissent avec I2. Concernant le gène *TGME49-245550*, nous avons noté, chez les parasites PRU-ku80-245550-Haflag, aucune modification du marquage que ce soit au niveau de la localisation ou de l'intensité du marquage lui - même, démontrant que ce gène ne serait pas affecté par le produit I2 (Figure 23A). Par contre pour les parasites Pruku80-245530-mcherry, une baisse d'intensité du marquage et des parasites présentant un marquage seulement en point ont été observés soulignant que la protéine analysée ne diffuse pas au cours du temps (Figure 23B).

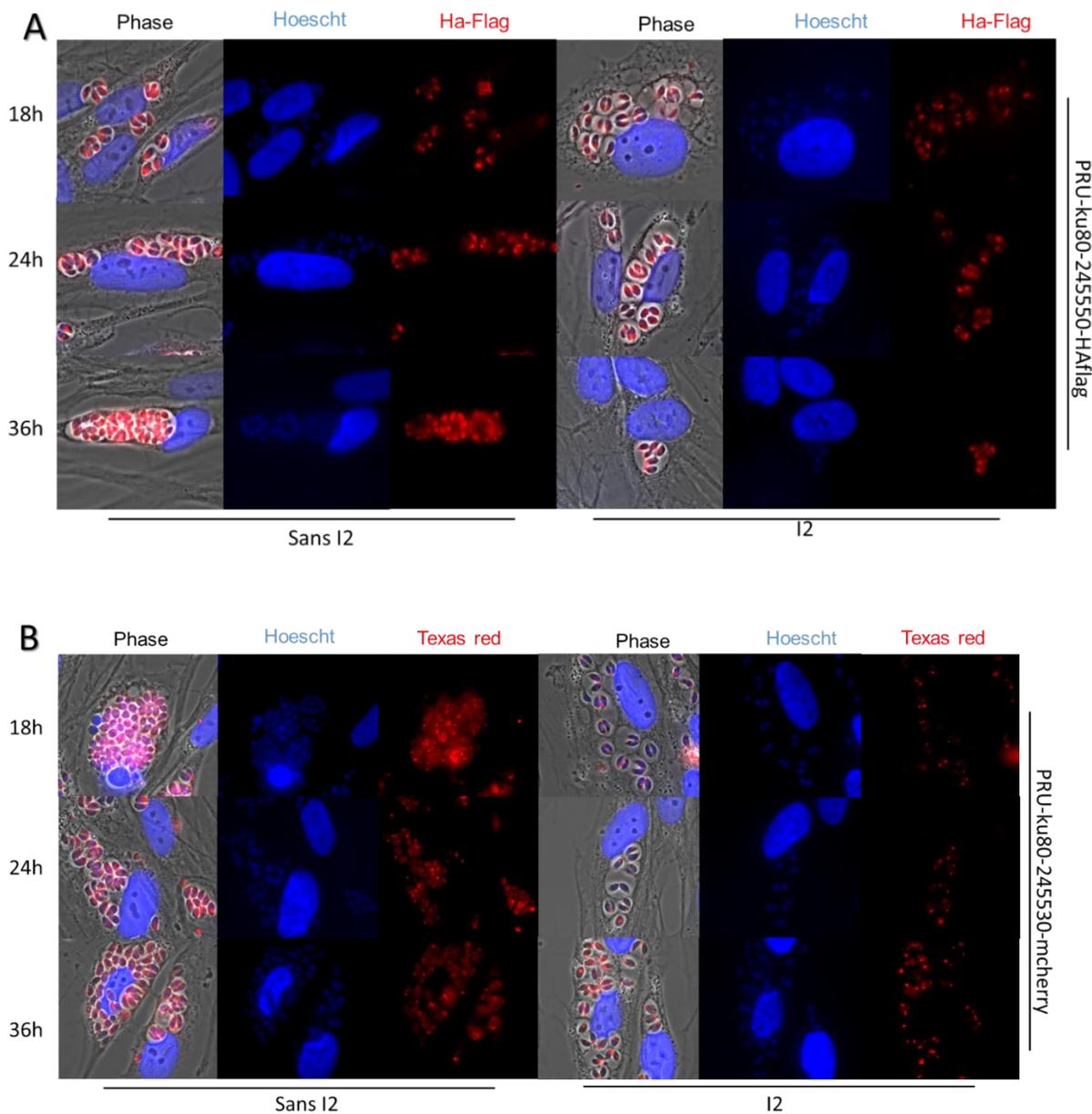


Figure 24 : Analyse du composé I2 sur *TGME49-245530* et *TGME49-245550*. Figure 23A : Image de microscopie en fluorescence des marquages réalisés dans des cellules HFF infectées par la souche *TGME49-245550-HAflag*, traitées ou pas avec I2 pendant 18h, 24h et 36h. Les cellules sont fixées puis marquées avec l'anticorps primaire anti-HA, et l'anticorps secondaire couplé à

l'ALEXA 594. Les noyaux sont marqués au HOESCHT. Figure 23B Image de microscopie en fluorescence des marquages réalisés dans des cellules HFF infectées par la souche TGME49-245530-mcherry, traitées ou pas avec I2 pendant 18h, 24h et 36h. Les cellules sont fixées. Les noyaux sont marqués au HOESCHT.

L'ensemble des résultats acquis ne permettent pas de savoir si le changement observé du marquage est réellement du et relié au phénotype « bubble » vacuole, et non au défaut de croissance déjà observé chez les parasites sous I2. Pour répondre à cette question la drogue FR235222 a été utilisée en contrôle, car cette drogue est connue pour stopper la croissance du parasite. Les parasites ont été traités séparément avec la drogue I2 et FR235222, avec les mêmes cinétiques, pour comparer la localisation du marquage et l'intensité de fluorescence avec des parasites non traités. Nous avons constaté que les parasites, traités avec FR235222, ont eux aussi comme les parasites traités avec I2 une baisse d'intensité du marquage et que le marquage n'est pas identique à des parasites non traités (Figure 24). En prenant en compte l'ensemble de ces résultats, le gène *TGME49-245530* ne semble pas être la cible du composé I2 et impliqué dans phénotype « bubble » vacuole. Ceci n'exclut pas qu'il pourrait toutefois être la cible de la drogue I2 en ce qui concerne le phénotype de croissance du parasite ou que ce gène est impliqué dans la croissance du parasite.

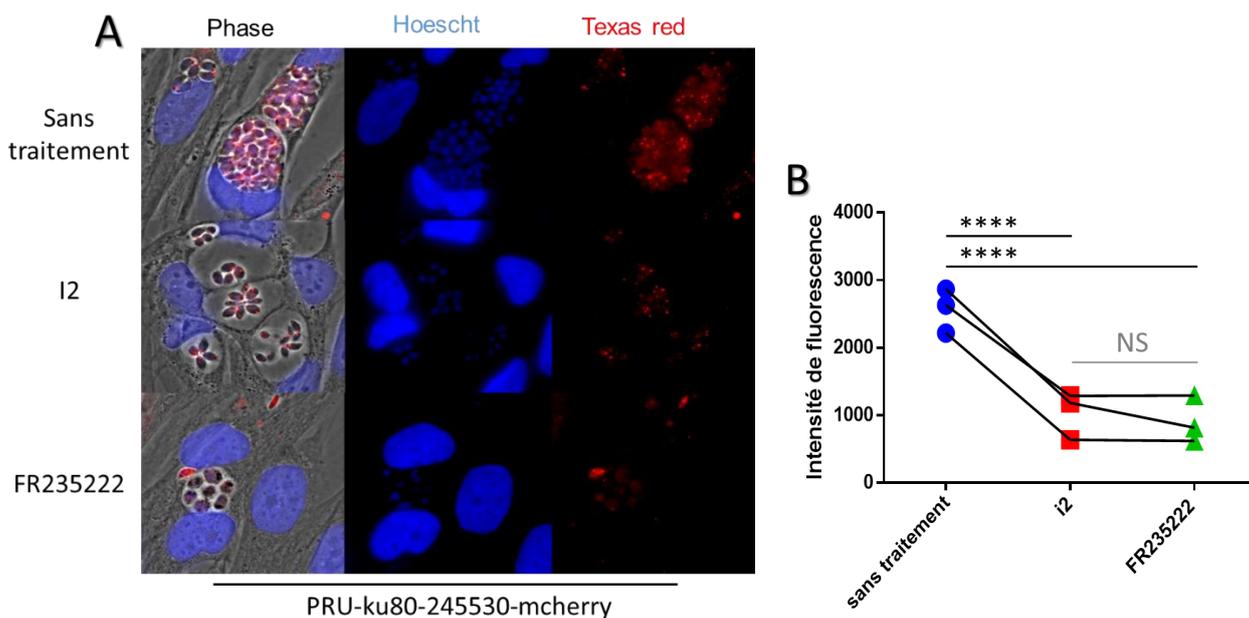


Figure 25 : Analyse du composé I2 et FR235222 sur TGME49-245530. Figure 24A : Image de microscopie en fluorescence des marquages réalisés dans des cellules HFF infectées par la souche TGME49-245530-mcherry, traitées ou pas avec I2 ou FR235222 pendant 18h. Les cellules sont fixées puis marquées. Les noyaux sont marqués au HOESCHT. Figure 24B : Mesure de l'intensité de fluorescence des vacuoles de souche TGME49-245530-mcherry dans les différentes conditions. L'intensité a été calculée grâce au logiciel Zen. ** est égale à une p value de $\leq 0,0001$**

En ce qui concerne l'étude pour le gène *TGME49-255570*, comme ce gène est essentiel pour la survie du parasite il est difficile d'en faire une étude avec un système de délétion par CRISPR-CAS9. De ce fait une autre approche a été faite avec un système de KO-inductible et aussi tagué

HAflag dans le même vecteur. Malheureusement à ce jour nous n'avons pas de résultats pour l'étude de ce gène.

B. Etude du gène TG-229480

1. Résultats préliminaires

Ce gène a été sélectionné dans notre étude car il est potentiellement susceptible d'être impliqué dans la croissance du parasite et avoir un phénotype plus précis chez les macrophages selon des données échangées entre notre laboratoire et celui de Jeroen Saeij. En effet dans le laboratoire de Jeroen Saeij *via* une collaboration avec le laboratoire de Sebastian Lourido, une bibliothèque génomique a été conçue avec des cibles dans le génome, dénommées : gRNA, (ce sont des séquences de nucléotides reconnus par la Cas9) utilisées pour fabriquer des mutants et invalider les fonctions d'un gène à l'aide du système CRISPR-Cas9 (Sidik et al, 2016). Pour réaliser ce criblage de perte de fonctions d'un gène, les plasmides contenant les gRNA ont été transfectés dans la souche de type I RH qui exprime de manière constitutive l'endonucléase Cas9 (RH-Cas9). Après 4 passages dans des cellules HFF, les gRNA sont amplifiés à partir de l'ADN des parasites et quantifiés par séquençage Illumina. L'abondance des gRNA entre les passages 1 et 4 permet d'établir un score pour chaque gène sur le critère du phénotype de fitness du parasite (annexe 1). Un score phénotypique négatif indique une diminution de l'abondance des gRNA. Par la suite le criblage a été perfectionné en utilisant, en parallèle des HFF, des macrophages et aussi en utilisant des cellules prétraitées à l'IFN γ . L'intérêt n'est pas de trouver des gènes qui ont un fort défaut de fitness (c'est-à-dire essentiels) mais qui participe à celle-ci. Aussi, après le quatrième passage les parasites survivants sont repassés trois fois dans des cellules stimulées ou non à l'IFN γ , puis analysés de nouveau au séquençage Illumina pour regarder l'abondance de gène (Annexe 2). Ce criblage a permis d'identifier plusieurs gènes, dont TG-229480 montrant des phénotypes dans les HFF, les macrophages plus ou moins stimulés. A ce jour, il est impossible de donner plus d'informations sur ces résultats obtenus dans le laboratoire de Jeroen Saeij, car les travaux sur ce gène ne sont pas encore publiés. Dans notre laboratoire, des travaux sur ce gène ont débuté et les premiers résultats indiquent un léger défaut de croissance chez le parasite. Toutefois la souche utilisée pour les expériences dans notre laboratoire est une souche de type II alors que la souche utilisée dans le laboratoire de Jeroen Saeij est une souche de type I. Afin de confirmer les résultats entre les deux laboratoires, l'étude de ce gène a été repris depuis le début. Pour cela plusieurs outils ont été développés dont une souche de parasite RHku80- Δ 229480 et une souche de parasite RHku80-229480-HAflag.

2. Génération d'une souche épitope tagué et délété pour le gène TG-229480

Pour cette étude nous avons travaillé avec deux souches de type I, la RH-ku80 et la RH-ku80-YFP, cette dernière est une souche qui possède une fluorescence dans le vert. Ces souches ont été transfectées avec le vecteur P-LIC, pour taguer l'épitope, (voir procédé décrit dans la partie matériel et méthode). Un clone a été isolé après sélection positive à la pyriméthamine, car le plasmide possède une cassette de résistance à cet antibiotique, et contrôlé par immunofluorescence avec un anti-HA. Quant à la délétion du gène TG-229480, la souche RHku80-YFP a été transfectée selon la méthode CRISPR-CAS9 décrit dans le matériel et méthode, la sélection a aussi été effectuée par la pyriméthamine et deux clones ont été isolés après vérification par PCR (Figure 25). En effet les parasites qui ont la délétion pour le gène *TG-229480* ont une séquence nucléotidique plus longue que celle présente chez les parasites n'ayant pas intégré le vecteur.

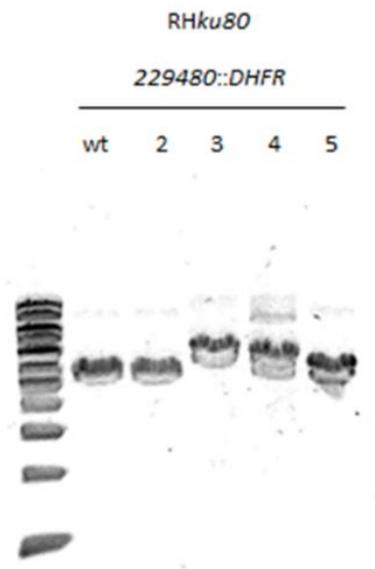


Figure 26 : Mise en évidence de clone de parasite délété pour *TGGT1-229480*. Gel d'électrophorèse, de produit PCR du gène 229480, les échantillons 3 et 4 ont des fragments plus long dû à l'intégration du plasmide. Les échantillons 2 et 5 ont un fragment identique à celui du contrôle (WT)

1. Imagerie et localisation de la protéine.

Afin de connaître la localisation de la protéine, des doubles marquages en immunofluorescence sont réalisés en extracellulaire et intracellulaire avec les anticorps anti-HA et d'anti-GRA1 ou anti-GRA7 sur les parasites RHku80-YFP-229480-HAflag. Les marquages extracellulaires vont nous permettre de connaître la localisation de la protéine et de déterminer précisément à quelle organelle du parasite elle appartient, comme par exemple, aux denses granules ou rhoptries, car en extracellulaire il n'y pas de sécrétion des protéines qui sont localisées dans leurs organelles. Les marquages intracellulaires vont nous permettre d'élucider si cette protéine est sécrétée dans la vacuole et au-delà de celle

En ce qui concerne les doubles marquages extracellulaires, nous montrons que la protéine du gène 229480 ne co-localise ni avec GRA1 ni avec GRA7 (Figure 26A et Figure 26B). Cette protéine apparaît distribuée dans des structures tout le long du parasite et vers le conoïde.

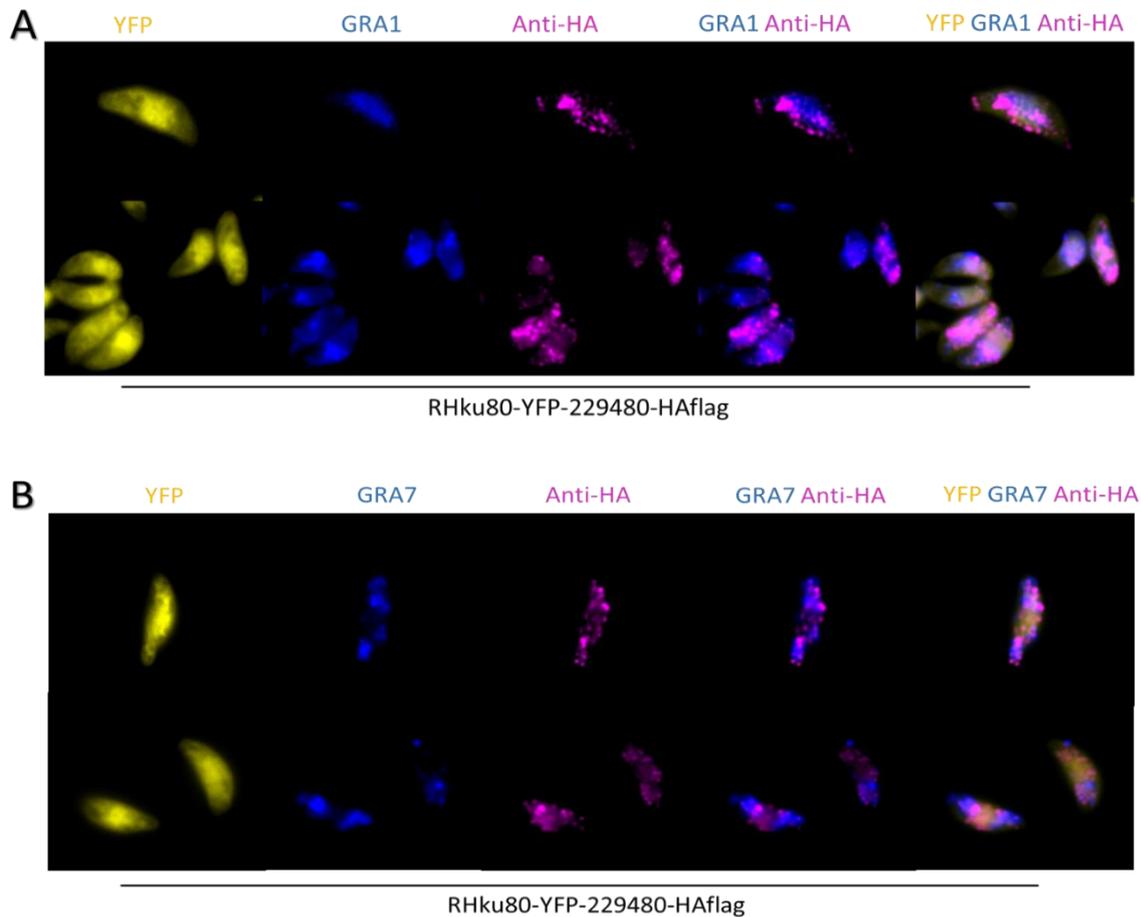


Figure 26 : Microscopie en fluorescence du gène 229480 chez des parasites en extracellaire. **Figure 26A :** Image de microscopie en fluorescence des triples marquages réalisés chez la souche TGGT1-229480-YFP-HAflag. Les parasites sont fixés puis marqués avec l'anticorps primaire anti-HA et par l'anticorps primaire anti-GRA1, puis réciproquement par les anticorps secondaires couplé à l'ALEXA 594(rose) ou ALEXA 405(bleu). Les parasites ont une fluorescence YFP (jaune) **Figure 26B :** Image de microscopie en fluorescence des triples marquages réalisés chez la souche TGGT1-229480-YFP-HAflag. Les parasites sont fixés puis marqués avec l'anticorps primaire anti-HA et par l'anticorps primaire anti-GRA7, puis réciproquement par les anticorps secondaires couplé à l'ALEXA 594(rose) ou ALEXA 405(bleu). Les parasites ont une fluorescence YFP (jaune).

L'analyse des doubles marquages en intracellulaire indique une co-localisation avec GRA1 et GRA7 et que la protéine étudiée est sécrétée dans la vacuole du parasite mais ne semble pas être sécrétée au-delà de celle-ci. Cette protéine apparaît se distribuer dans l'espace vacuolaire comme GRA1 et GRA7 et resterait dans les mêmes zones (Figure 27A et Figure 27B). Toutefois, l'analyse des images de microscopie indique que la protéine étudiée est en moindre quantité que GRA1 et GRA7.

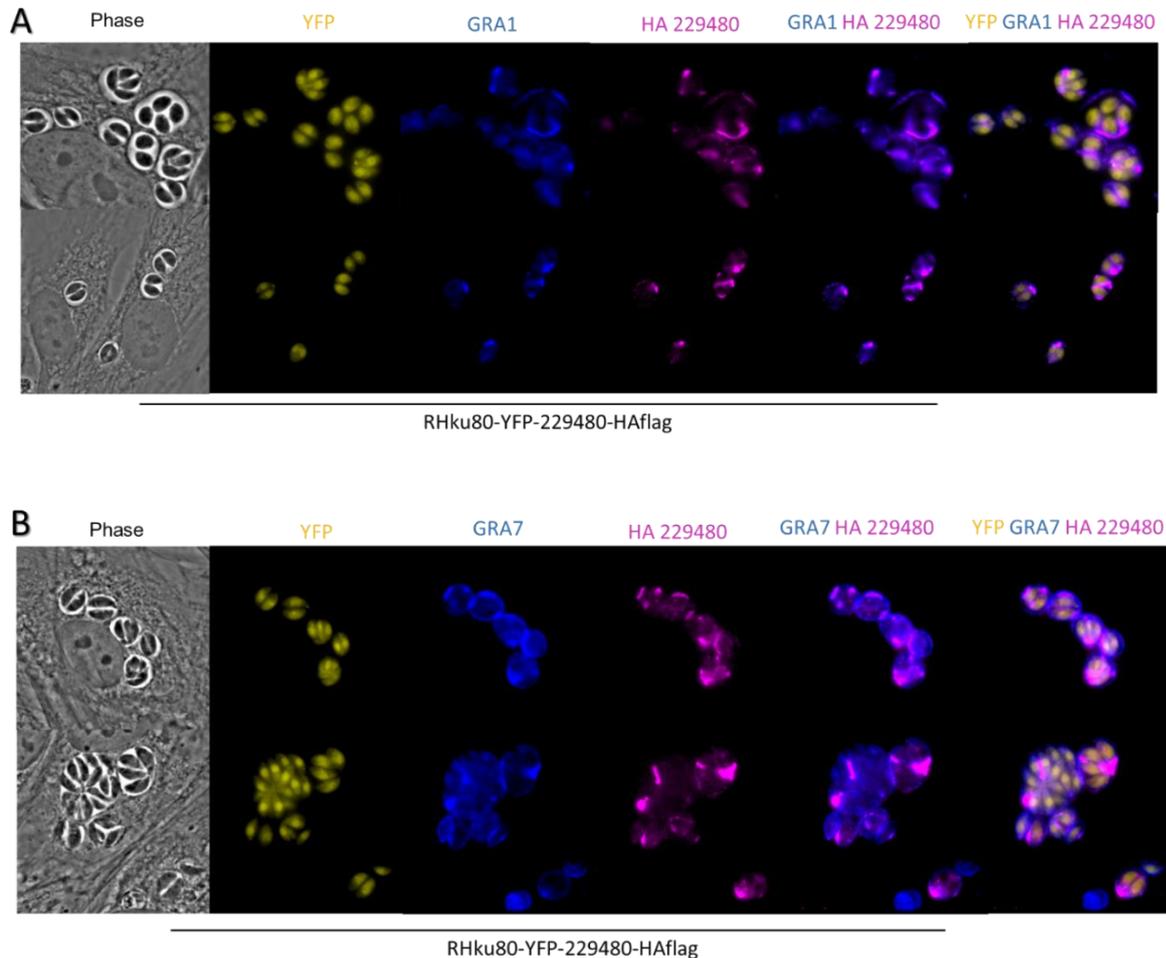


Figure 27 : Microscopie en fluorescence du gène 229480 chez des parasites en intracellulaire. Figure 27A : Image de microscopie en fluorescence des triples marquages réalisés chez la souche TGGT1-229480-YFP-HAflag. Les cellules sont infectées par la souche TGGT1-229480-YFP-HAflag, puis fixées et marquées avec l'anticorps primaire anti-HA et par l'anticorps primaire anti-GRA1, puis réciproquement par les anticorps secondaires couplé à l'ALEXA 594(rose) ou ALEXA 405(bleu). Les parasites ont une fluorescence YFP (jaune) Figure 27B : Image de microscopie en fluorescence des triples marquages réalisés chez la souche TGGT1-229480-YFP-HAflag. Les cellules sont infectées par la souche TGGT1-229480-YFP-HAflag, puis fixées et marquées avec l'anticorps primaire anti-HA et par l'anticorps primaire anti-GRA7, puis réciproquement par les anticorps secondaires couplé à l'ALEXA 594(rose) ou ALEXA 405(bleu). Les parasites ont une fluorescence YFP (jaune).

2. Plage de lyse et défaut de croissance

D'après des résultats préliminaires, les parasites délétés pour le gène TG-229480 ont un défaut de croissance. Pour vérifier ce résultat nous avons effectués des plages de lyses. En bref, dans une plaque de 24 puits, préalablementensemencée avec des HFFs, 200 parasites WT et issus des deux clones RHku80-YFP- Δ 229480 ont été ajoutés et ceci en triplicatas. Puis la plaque a été placée une semaine dans un incubateur. Les parasites vont se multiplier et lyser le tapis de cellules HFF en formant des plages, un défaut de croissance peut se détecter par l'aire de des plages de lyses qui est diminuée. Au bout d'une semaine le nombre de plage de lyse est compté

et la surface des plages est mesurée. Dans notre expérience nous constatons qu'effectivement l'aire des plages de lyses de nos deux clones est significativement plus faible que l'aire de la souche WT (Figure 28A), bien que le nombre de plage de lyse ne soit pas différent (Figure 28B). Cela démontre que le parasite délété pour le gène TG-229480 n'a pas d'adversité pour infecter son hôte mais que sa réplication et sa croissance sont altérées.

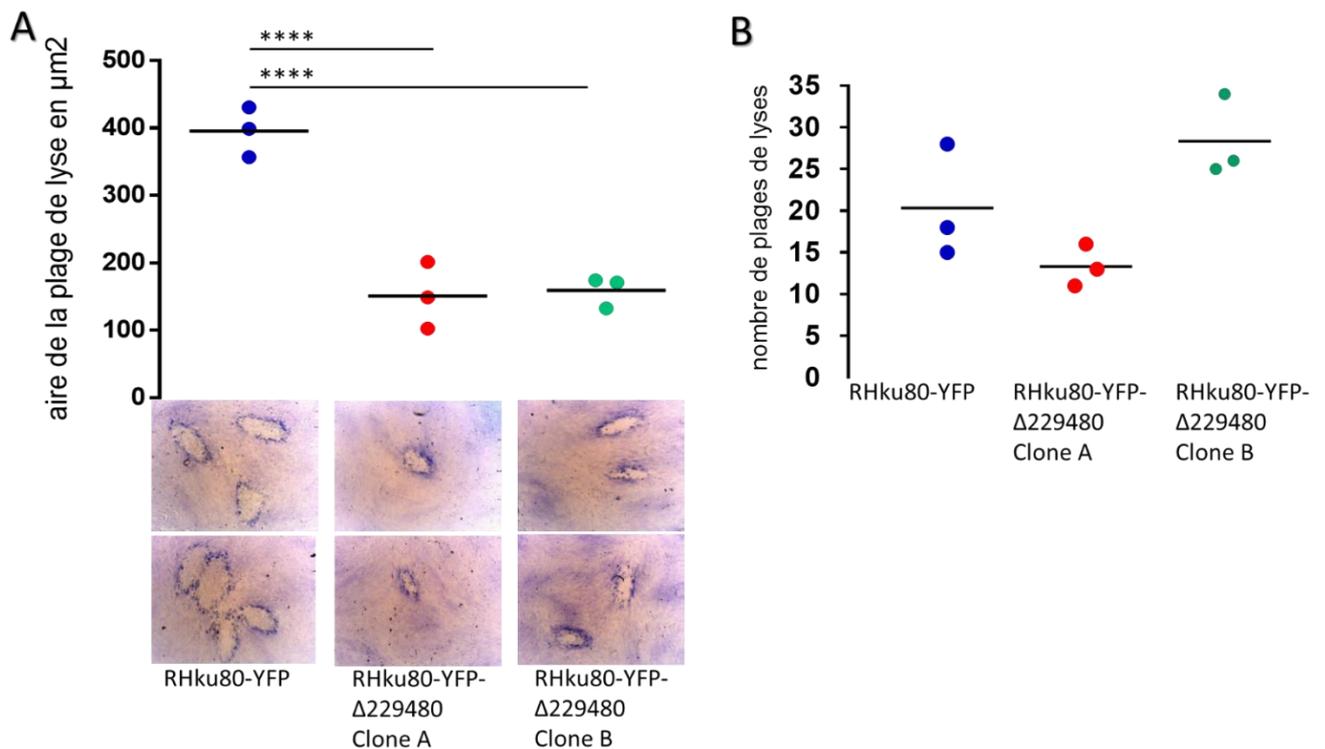


Figure 28 : Analyse plaque assay du gène 229480. Des cellules HFF sont infectées avec les souches RH-ku80-YFP, RH-ku80-Δ229480A (clone A) RH-ku80-Δ229480B (cloneB) pendant 1 semaine, et colorées au GIESMA. Les plages de lyse formées sont analysées. Chaque point représente la moyenne d'une expérience faite en triplicata. Figure 28A : Analyse de l'aire des plages de lyse des souches RH-ku80-YFP, RH-ku80-Δ229480A (clone A) RH-ku80-Δ229480B (cloneB). **** est égale à une p value de $\leq 0,0001$. En-dessous de chaque échantillon est imagés les plages de lyses. Figure 28B : Analyse du nombre de plages de lyse chez les souches RH-ku80-YFP, RH-ku80-Δ229480A (clone A) RH-ku80-Δ229480B (cloneB).

3. Défaut de croissance, teste de compétition

Pour confirmer les résultats de défaut de croissance, nous avons réalisé un autre type d'expérience, en mettant en compétition, des parasites WT et des parasites délétés pour TG-229480. Plus précisément des HFF sont co-infectées avec des parasites WT et des parasites KO_TG-229480, ces parasites expriment respectivement des molécules fluorescente la mcherry et la YFP, ce qui permet d'effectuer des mesures de cyrtométrie en flux pour connaître l'enrichissement d'une population. Avant de mettre en compétition les deux souches WT et KO, une première expérience est réalisée afin de vérifier la faisabilité de l'expérience. En bref artificiellement différents ratios, soit 100 pour 50, 50 pour 50, 25 pour 50, 12,5 pour 50 et 6,15

pour 50, parasites WT exprimant la mcherry ou la YFP sont ajoutés dans du PBS puis analysés au FACS. Les résultats rapportés dans la Figure 29 montrent que nous avons une droite proportionnelle que ce soit quand le nombre de parasites WT mcherry ou de YFP ne varie pas. Nous avons remarqué qu'il n'y a pas d'interférence entre les deux molécules fluorescentes, et qu'un faible taux de parasites ne sont détectés dans aucune fluorescence.

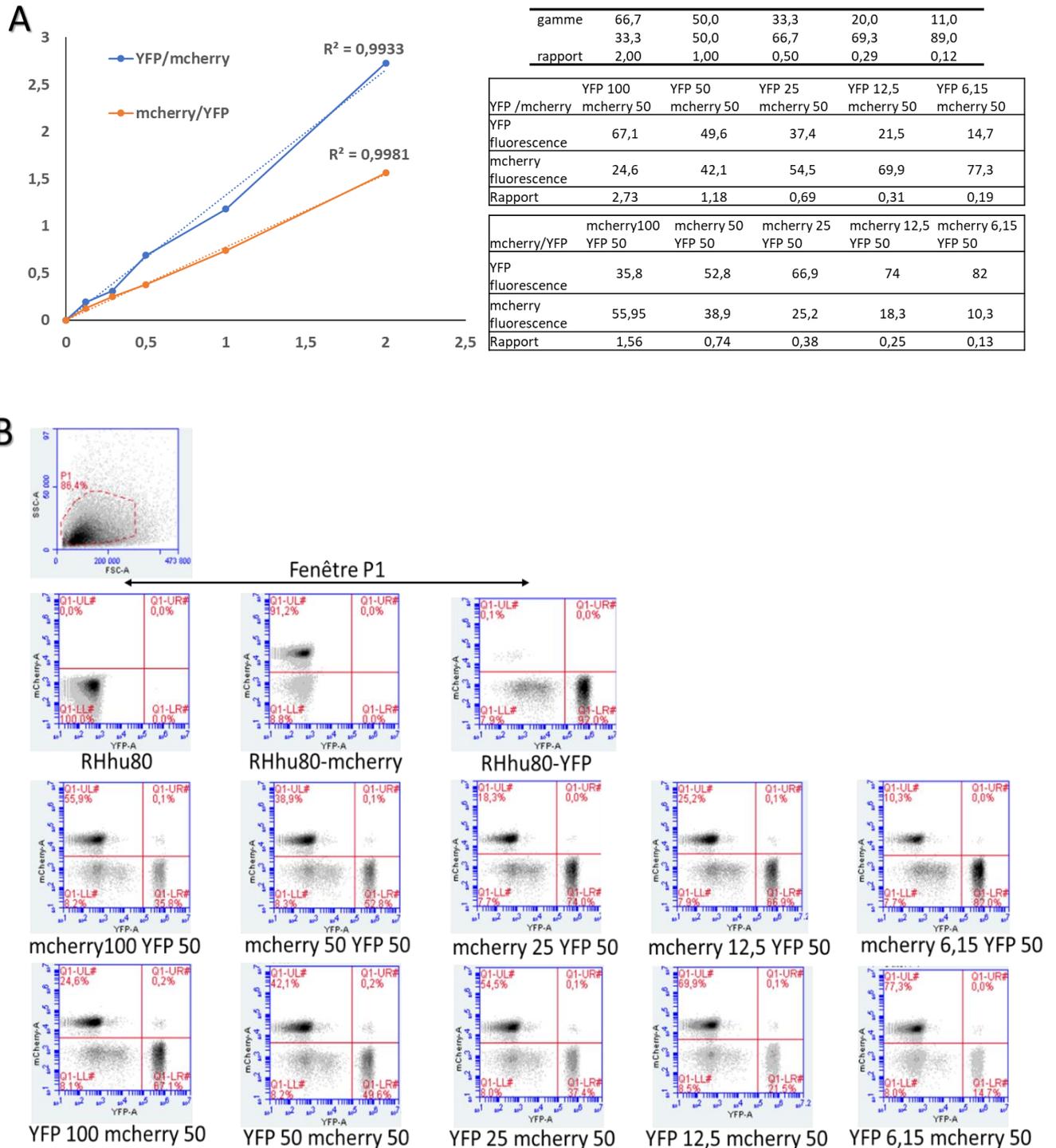


Figure 29 : Analyse FACS du test de compétition entre les souches WT-mcherry/WT-YFP. Figure 29A : Courbe des gammes réalisées lors de la compétition. Figure 29B : Résultats FACS des échantillons des gammes.

L'expérience de compétition entre la souche WT-mcherry et KO-229480-YFP est mise en place vu que les contrôles et la faisabilité de cette dernière ont été vérifiés. En bref des cellules HFF sont infectées avec le même nombre de parasite RHku80-mcherry et RHku80-YFP- Δ 229480 ainsi que des contrôles RHku80-mcherry et RHku80-YFP. Une fois que les parasites ont lysés le tapis de HFF, une partie de la culture est mesurée au FACS et une autre partie sert à infecter d'autres HFF, ainsi plusieurs passages de parasites sont mesurés afin de les suivre dans le temps. L'expérience est répétée trois fois. Une des premières observations constatées est que chez le groupe contrôle, c'est-à-dire la compétition RHku80-YFP contre RHku80-mcherry, la population de RHku80-mcherry diminue au cours des passages, cette diminution arrive dès la deuxième lyse (L2) et parallèlement la population de RHku80-YFP augmente (Figure 30). Par contre au cours de la compétition entre les parasites WT et KO, c'est-à-dire RHku80-mcherry et RHku80-YFP- Δ 229480, il n'y a pas de différence de fluorescence ou d'enrichissement d'une des deux populations, même si au bout du 5ème passage (L5), on observe (Figure 30) que la courbe de la population de RHku80-mcherry passe au-dessus de celle de la population RHku80-YFP- Δ 229480 mais cette différence n'est pas significative.

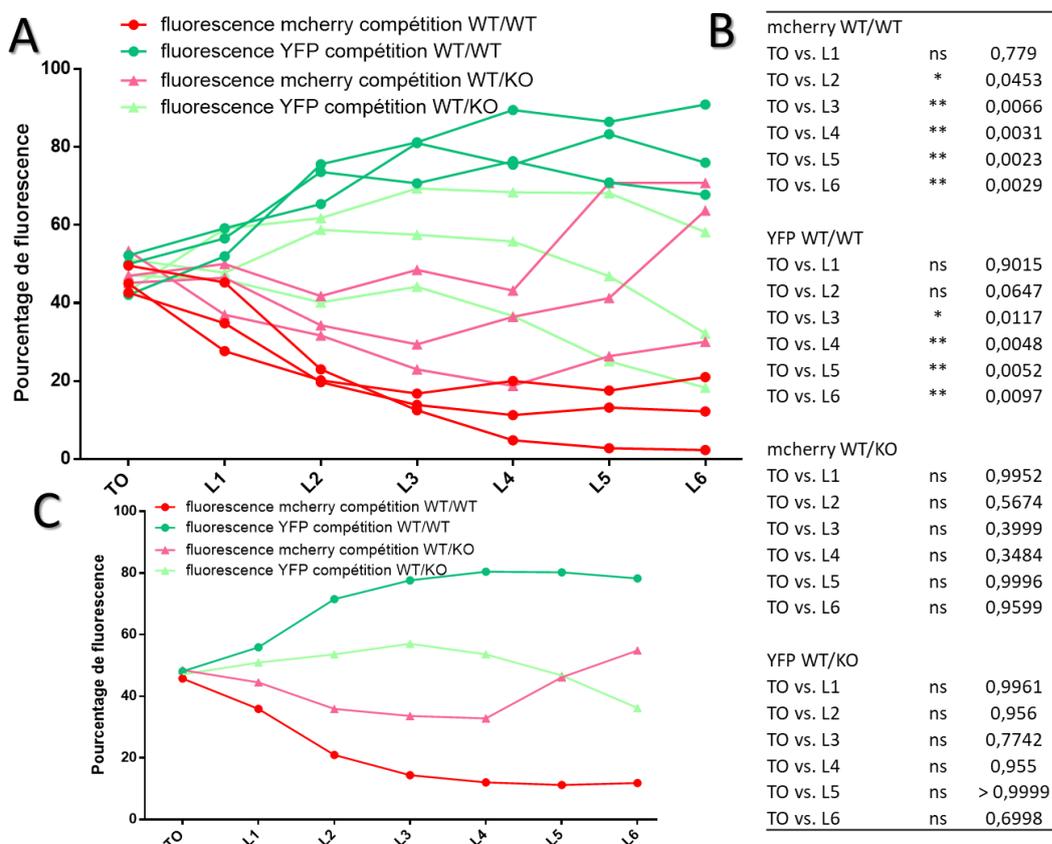


Figure 30 : Analyse FACS des compétitions WT/WT et WT/KO. Les cellules HFF sont infectées avec le même ratio par les souches RH-ku80-mcherry et RH-ku80-YFP (WT/WT) ou les souches RH-ku80-mcherry et RH-ku80-YFP- Δ 229480

(WT/KO) au cours de 6 passages. A chaque lyse (L) du tapis cellulaire, 50µL de culture est récupéré pour être mesuré au FACS. L'expérience a été répétée 3 fois. Figure 30A : Courbes de mesure du pourcentage de fluorescence mesuré à chaque lyse pour toutes les compétitions réalisées. Une courbe est égale à une compétition. Figure 30B : Analyse statistique des pourcentages de fluorescence mesurés lors des compétitions. Figure 30C : Moyenne des courbes de mesure du pourcentage de fluorescence mesuré à chaque lyse pour toutes les compétitions réalisées, selon la moyenne des trois expériences.

Du fait que dans notre groupe contrôle on observe une baisse significative de fluorescence des parasites RHku80-mcherry qui n'est pas observée lors de la compétition entre le WT qui est mcherry et le mutant qui est YFP, cela signifie que les parasites délétés pour le gène 229480 ont une croissance plus faible que les WT ayant la même fluorescence.

4. Plage de lyse et traitement à l'IFN γ

L'IFN γ est un des acteurs majeurs de la lutte contre le parasite. Il est intéressant d'étudier les mécanismes de résistance ou de sensibilité de *T. gondii* à cet cytokine afin de déterminer de nouvelles cibles moléculaires pour éliminer le parasite. Dans les expériences suivantes, nous avons appliqué les mêmes protocoles que ceux mis au point pour l'étude de l'analyse de la croissance du parasite, excepté que les cellules HFF sont prétraitées pendant 24h avec différentes concentrations d'IFN γ . Il est connu que des cellules traitées avant infection avec de fortes concentrations d'IFN γ résistent à l'infection et que cela se traduit par aucune plage de lyse visible. A des concentrations plus faibles d'IFN γ on peut voir apparaître des plages de lyses. Les concentrations d'IFN γ choisies pour ces expériences sont 15U pour la dose forte, 6U et 8U pour les doses intermédiaires. Dans cette série d'expériences, d'une part nous constatons toujours un défaut de croissance chez nos deux mutants délétés pour 229480, c'est-à-dire des plages de lyses d'aire plus petit que le WT dans les conditions sans traitement. De plus nous remarquons une diminution de l'aire des plages de lyse en fonction de la dose d'IFN γ chez le parasite WT (Figure 31). Ceci nous conforte sur l'interprétation des résultats car c'était le résultat attendu en tant que contrôle. De manière surprenante, nous remarquons que dans nos deux mutants délétés pour 229480, les aires de plage de lyse sont équivalentes à celle des WT en présence d'IFN γ , toutes doses confondues (Figure 31). Il est à noter que ces expériences ont été répétées 3 fois, et que chaque expérience a été réalisé en triplicata. Par contre, au contraire de ce qui est observé pour les WT, les aires de plage de lyse ne sont ni diminuées ni changées pour les deux mutants traités par des doses intermédiaire d'IFN γ , seule une différence significative est observable à une dose élevée d'IFN γ , soit le 15U (Figure 31).

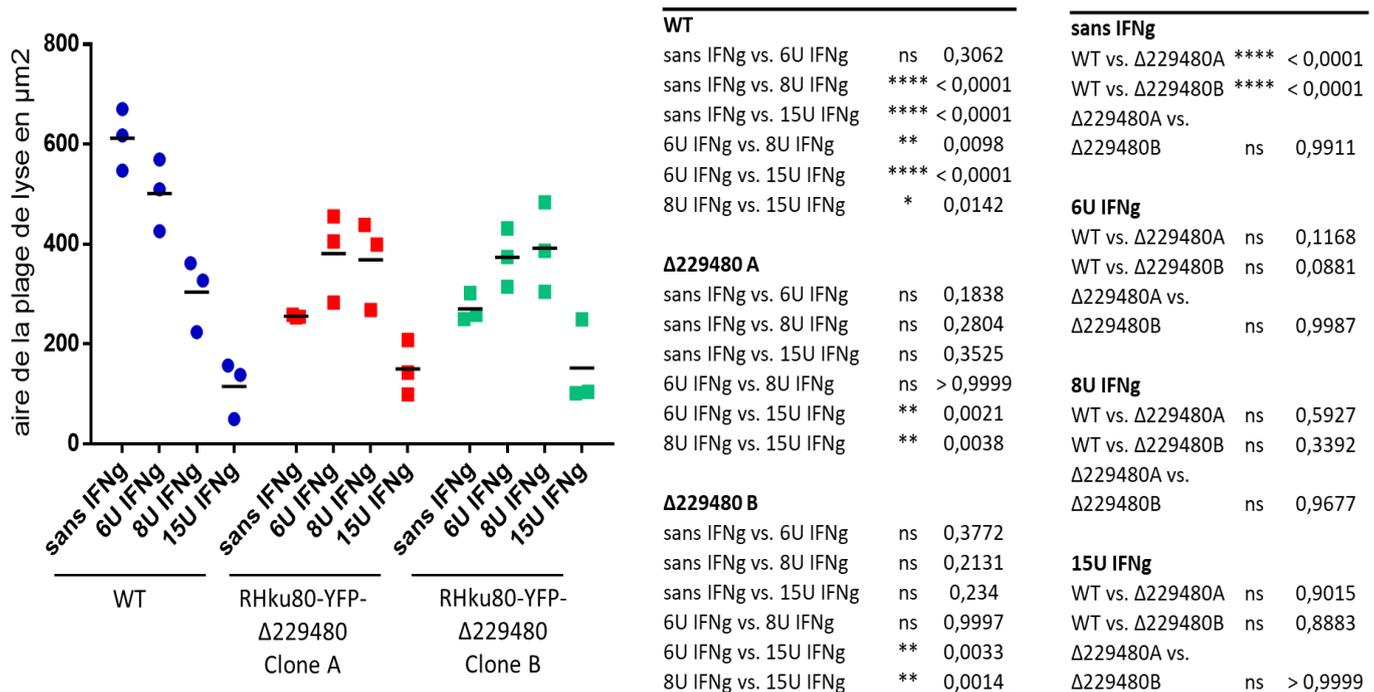


Figure 31 : Analyse des plaques assay et traitement à l'IFN γ . Les HFF sont pré-traitées pendant 24h avec différentes doses d'IFN γ (6U, 8U et 15U), puis infectées avec les souches WT, RH-ku80- Δ 229480 clone A et RH-ku80- Δ 229480B clone B pendant une semaine. Au bout d'une semaine les cellules sont colorées au bleu de Coomassie et les plages de lyse analysées. Le graphique représente les mesures des aires de plages de lyse, chaque point représente la moyenne d'une expérience réalisée en triplicata. Le tableau récapitule les résultats statistique entre les différents échantillons, selon les moyennes des trois expériences.

Pour implémenter ces résultats, le pourcentage d'inhibition de l'aire de plage de lyse est analysé. Ce pourcentage est calculé par rapport à l'échantillon sans traitement de chaque spécimen. D'une part nous remarquons chez le WT une progression de l'inhibition en fonction de la dose, ce qui est attendu comme résultat (Figure 32). D'autre part en ce qui concerne nos deux mutants nous ne remarquons pas une inhibition de l'aire sur les doses intermédiaires de traitement à l'IFN γ , au contraire nous observons une augmentation de l'aire de la plage de lyse. Toutefois à une forte dose d'IFN γ , nous avons une tendance à une diminution de l'aire de la plage de lyse, pour nos deux mutants (Figure 32).

Pour résumer ces expériences, nous constatons que la délétion du gène TG-229480 provoque un retard sur la croissance de notre parasite. Toutefois cette croissance ralentie n'est pas impactée par un traitement à des doses faible d'IFN γ , voire au contraire le parasite rattrape son retard ou du moins possède la même croissance qu'un parasite WT. Cependant à un traitement à forte dose d'IFN γ , les mutants et WT se comporte de la même manière. Ces résultats suggèrent la présence d'un mécanisme de résistance chez les parasites délétés pour 229480.

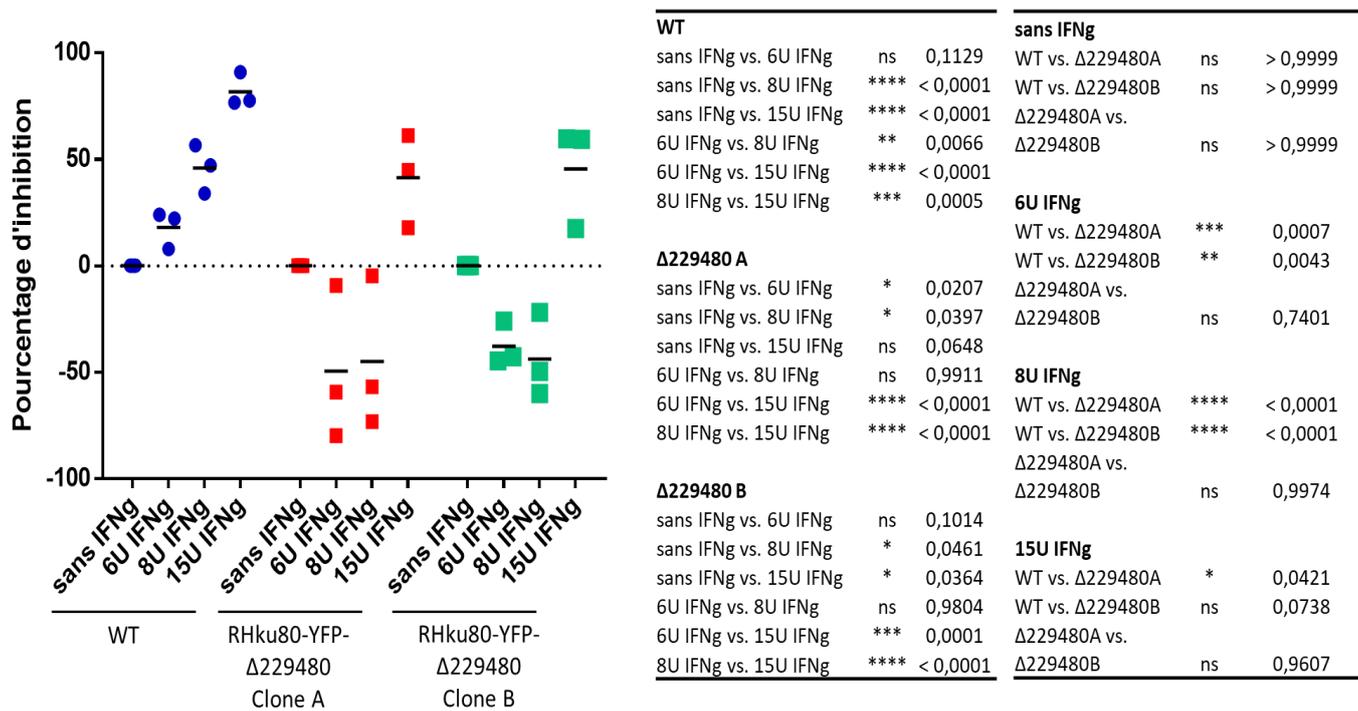


Figure 32 : Analyse des pourcentages d'inhibitions. Les HFF sont pré-traitées pendant 24h avec différentes doses d'IFN γ (6U, 8U et 15U), puis infectées avec les souches WT, RH-ku80-Δ229480 clone A et RH-ku80-Δ229480B clone B pendant une semaine. Au bout d'une semaine les cellules sont colorées au bleu de Coomassie et les plages de lyse analysées. Le graphique représente les mesures des aires de plages de lyse, chaque point représente la moyenne d'une expérience réalisée en triplicata. Le tableau récapitule les résultats statistiques entre les différents échantillons, selon les moyennes des trois expériences.

5. Immunoprécipitation TAB/TAK

Lors des résultats précédemment acquis par le laboratoire, une corrélation avait été trouvée entre la protéine 228480 et les protéines TAB/TAK par l'intermédiaire d'une analyse de masse spectrométrie en utilisant des cellules RAW (macrophages de souris) et la souche P μ ku80-229480-HAflag. Nous avons voulu confirmer ce résultat, en utilisant des HFF et la souche RHku80-229480-HAflag en s'appuyant sur une technique d'immunoprécipitation. Brièvement, 20 flasques de T180 sontensemencées avec des HFF puis infectées par la souche RHku80-229480 et RHku80-229480-HAflag, à une forte MOI. Les protéines sont extraites puis immunoprécipitées grâce au HA et des billes d'affinités afin de récolter les protéines associées aux complexes de notre protéine soit du HA. Puis, un western blot est réalisé et révélé à l'aide des anticorps anti-TAB et anti-TAK et le système de colorimétrie à la HRP. Malheureusement nous n'avons pas mis en évidence ces protéines. Par cette approche, il y a eu aucune révélation de protéines et les western blot ont été réalisés deux fois. La différence entre les résultats des deux expériences peut être liée soit à la souche de parasite ou soit aux cellules utilisées.

IV. Discussion & perspective

Comme énoncé précédemment l'interconversion entre les différents stades du parasite est au centre de la pathogénèse. Cette faculté du parasite est modulée par des facteurs transcriptionnels. C'est pour cette raison que l'étude de composé agissant sur le génome, comme FR235222 et I2, est une voie de recherche originale pour comprendre les mécanismes transcriptionnels du parasite et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Alors que FR235222 est décrit comme ciblant les HDACs et peut induire le stade bradyzoïte chez le parasite *T. gondii*, la molécule I2, bien que possédant des propriétés similaires, présente d'autres caractéristiques. En effet, l'ensemble de nos travaux sur la molécule I2 montre, que celle-ci induit deux phénotypes principaux : un phénotype sur la croissance parasitaire indépendant de la souche infectante et un phénotype de déformation de la vacuole qui varie en fonction du type parasitaire utilisé. Nous avons démontré que la molécule n'a pas les propriétés à induire le stade bradyzoïte contrairement à d'autre HDAC inhibiteur comme FR235222. Toutefois, I2 provoque une inhibition de la croissance du parasite, soulignant que le mécanisme moléculaire qui sous-tend le phénomène d'interconversion est plus complexe. Il est à noter que nous ne connaissons pas exactement la ou les cible(s) du composé I2 chez *T. gondii*, et bien que ce composé ait été décrit comme un inhibiteur HDAC de classe 2 dans le règne animal et végétal, nous ne savons pas sur quelle famille de HDAC agit précisément ce composé chez les parasites. Ceci documente que même si le phénomène d'interconversion est dominé par des phénomènes épigénétiques, les cibles potentiels peuvent être plus compliquées à identifier.

Nos travaux se sont principalement concentrés sur le phénotype de la vacuole. Il est à noter que bien qu'il existe qu'un seul genre de *T. gondii*, au contraire des autres parasites du phylum *Apicomplexa*, les souches de *T. gondii* sont très différentes entre-elles, montrant une très grande hétérogénéité et reflétant que *T. gondii* a su s'adapter à son environnement et à sa multitude d'hôtes intermédiaires et définitifs. Il est intéressant de percevoir que la présence d'une molécule selon les souches étudiées, a une action différente, et ceci au sein d'un même type. Par exemple, en présence du composé I2, le type GT1 n'acquiert pas le phénotype de la vacuole déformée alors que le type RH l'a acquis. Ainsi nos expériences confirment qu'au sein même d'un type donné du parasite *T. gondii*, la variation génique est importante, comme il a été démontré auparavant avec GRA15, la souche GT1 a une protéine fonctionnelle alors que la RH possède un codon stop qui termine précocement la protéine et empêche son bon fonctionnement (Yang et al, 2013).

Nous avons donc entrepris de caractériser le phénotype de déformation de la vacuole. Dans un premier temps, nos résultats nous ont conduit à faire le constat que la déformation de la vacuole ne perdurait pas dans le temps si on supprimait la drogue du milieu de culture, et ce résultat a été observé également pour le phénotype « délais de croissance ». Ceci démontre que le parasite est sensible à un stress et à son environnement. Les expériences de cinétique de temps d'incubation de la drogue I2 au cours du cycle d'infection du parasite, indique que le produit I2 altère rapidement les mécanismes liés au parasite car dès 4h d'incubation les effets sur la vacuole sont visibles. La déformation de la vacuole n'altère en rien les fonctions de celle-ci, y compris au niveau des échanges et sur l'exportations des protéines comme les GRA, même si nous avons remarqué des différences pour GRA1 et GRA7 entre les parasites de *T. gondii* traités par I2 et ceux non traités. Cependant nous ne pouvons pas exclure que les différences observées soient le reflet d'une altération de la reconnaissance des épitopes des protéines étudiées par l'anticorps. A noter que les autres marquages analysés sont ciblés sur le HA de souche épitope tagué, ce qui est différent de l'approche choisie pour suivre l'expression de GRA1 et GRA7. Il est possible que la déformation de la vacuole induise un léger changement de conformation de la protéine étudiée et que les épitopes soient alors moins bien reconnus par l'anticorps ou que la déformation de la vacuole rende les épitopes de la protéine moins accessible à l'anticorps. Ces deux hypothèses nous semblent tangibles car il nous paraît curieux que ces deux GRA soient altérées par I2. D'une part, car GRA1 est essentielle aux parasites et ceux, qui ne l'expriment pas, meurent, d'autre part, les fonctions de ces deux GRA sont complètement différentes. Pour déterminer définitivement si I2 modifie ou pas l'expression de GRA1 et GRA7, il serait judicieux soit de refaire les marquages avec un anticorps polyclonal qui reconnaîtrait plusieurs épitopes, soit de faire des souches épitope tagué car nous savons que le HA n'est pas perturbé, et de confirmer les résultats par western blot.

Nous avons tenté de comprendre quel impact avait la vacuole distendue sur les GRAs. Il est intéressant de remarquer que I2 induit le même phénotype que celui observé par la délétion de GRA17 mais que la présence de I2 n'inhibe pas la sécrétion de GRA17 (Gold DA et al, 2015). Cependant il n'est pas connu pourquoi les parasites qui, ont perdu l'expression de GRA17, développent une vacuole déformée. Il est possible que le phénotype de déformation de la vacuole résultant de la perte de l'expression du gène GRA17 ou du traitement par I2, soit l'altération d'un gène ou de mécanisme moléculaires partagés. Plus précisément la délétion de GRA17 peut entraîner certaines modifications de gènes ou mécanismes moléculaires qui seraient la cible de la drogue I2, ayant pour conséquence la déformation de la vacuole.

Dans notre étude de criblage génétique sur les progénies nous avons réussi à identifier une région du génome qui est susceptible de contenir le gène cible de la molécule I2 chez *T. gondii*. Nous avons analysé deux gènes en utilisant différentes approches et les travaux menés suggèrent que ces deux gènes et leur expression ne sont pas les cibles de la drogue I2. Afin d'éviter de tester un à un tous les gènes de cette région, nous proposons de mettre en place les expériences suivantes. Premièrement, nous ne savons pas si la drogue I2 interfère ou pas avec le cycle de vie de parasites de type III de *T. gondii*. Il serait intéressant de réaliser les mêmes séries d'expérience que celles qui ont permis de mettre en évidence les deux phénotypes observés en testant les parasites de type I et II et, en fonction des résultats d'établir le croisement type I/type III ou type II/type III (Herrmann et al, 2012), ce qui permettrait peut-être d'affiner la région. Deuxièmement il existe les cosmides (Vinayak et al, 2014) et des vecteurs comprenant plusieurs gènes, ces derniers ont été conçus dans la souche RH, il est alors possible de transférer ces différents cosmides dans une souche ne formant pas la vacuole et par la suite d'observer en présence de la drogue quels sont cosmides qui contribuent à la déformation de la vacuole. Cela permettrait également de réduire la région à investiguer. Toutefois cela inclus de transférer les cosmides dans la souche GT1, or celle-ci est plus sensible aux transfections. De plus, les souches utilisées pour les transfections sont délétées pour le ku80 (Huynh et Carruthers, 2009), une enzyme qui permet la réparation de l'ADN. Cette délétion permet une intégration plus efficace des vecteurs. Malheureusement, comme la souche GT1 exprime la protéine Ku80, les transfectants sont plus difficile à obtenir, mais les transfections avec la souche GT1 sont possible à réaliser. Une autre possibilité est d'utiliser la banque de données ToxoDB. En effet cette banque possède des données en fonctions des souches et surtout sur les différents SNP entre les souches. La différence de phénotype entre les souches peut être due à un SNP présent selon les souches. Les SNP peuvent soit altérer la protéine soit la rendre non fonctionnelle. Ainsi, la protéine pourrait toujours être présente entre les deux souches mais ne pas avoir exactement la même fonction ou soit être complètement absente. L'étude des SNP entre les souches traitées ou pas par la drogue I2 pourrait s'avérer être pertinente. Grâce à ToxoDB il est possible de comparer les SNP entre plusieurs souches ou groupes de souches, en se basant sur la présence ou pas du phénotype, à partir de la région génomique recherchée et obtenir des gènes avec des SNP présents. Par cette approche on a obtenu les gènes candidats suivants : *TGME-245530*, *TGME-245640* et *TGME-245770*. Le gène *TGME-245530* est un des gènes que nous avons étudiés, par contre nous n'avons pas retrouvé *TGME-245550* ni *TGME-245570*. Le gène *TGME-245570* code pour ORC2 un complexe de remodelage de l'ADN. Nous avons tenté de l'étudier mais aucune transfection a été positive et ceci ne nous a

pas permis d'analyser ce gène candidat. Si les résultats ne sont concluants pour l'instant sur *TGME-245530*, il nous semble intéressant de poursuivre l'étude de ce dernier car dans une étude menée par Pittman et al, 2014, ce gène a été montré comme fortement exprimé dans le cerveau de souris infectés, c'est-à-dire à un stade kystique/bradyzoïte. Cependant, ce qui reste ambiguë, est que dans nos expériences, en utilisant la drogue FR235222, qui induit un stade bradyzoïte, le résultat du rôle potentiel de *TGME-245530* n'est pas confirmé. Il est connu que FR235222 n'induit pas complètement un stade bradyzoïte, il est très similaires. Ainsi, le composé FR235222 n'est peut-être pas le bon contrôle dans notre expérience. Il existe d'autres méthodes connues pouvant induire le stade bradyzoïte, la variation du pH (Soete et al, 1993 ; Soete et al 1994 ; Weiss et al, 1995), l'exposition à l'IFN γ (Bohne et al, 1993 ; Bohne et al, 1994) et le compound 1 (Gurnett et al, 2002 ; Nare et al ; 2002 ; Radke et al, 2006), et pourraient être testés en comparaison pour affirmer ou infirmer si le gène *TGME-245530* est une cible potentielle ou non du composé I2. Il est aussi possible d'envisager que la protéine du gène ciblé fasse partie d'un complexe protéique et qu'elle soit en interaction avec d'autres protéines qui elles sont impliquées directement dans le phénotype observé. Si cela est le cas, une étude par imagerie rendant simplement compte de la comparaison entre les deux drogues n'est pas pertinente, l'analyse devant plus complexe car il faut identifier les protéines partenaires associées. Il est devenu classique de déléter un gène pour en déterminer son rôle. Dans l'étude du composé I2 nous ne connaissons pas si ce composé est capable soit d'activer ou soit d'inhiber la fonction du produit d'un gène impliqué dans le phénomène de distorsion de la vacuole. Si l'expression d'un gène est activée en présence du composé I2, ce qui est à considérer car dans l'analyse des résultats préliminaires transcriptomiques, il est montré, que l'expression de plusieurs gènes est augmentée, l'étude du gène candidat par délétion de ce dernier peut être biaisée. En effet, si dans les conditions normales d'infection le gène n'est pas exprimé, la délétion de ce gène conduira à la même observation que celle observée dans des conditions normales sans traitement, c'est-à-dire l'absence du phénotype vacuole déformée et ne permet pas de définir si ce gène est ou pas la cible du produit I2. Dans l'hypothèse où I2 inhibe l'expression d'un gène, la délétion de celui-ci devrait permettre de visualiser la déformation de la vacuole et d'associer le produit de ce gène au phénotype de vacuole déformée. Il est important de ne pas partir d'un résultat escompté pour décrire et analyser l'expérience. Une expérience complémentaire est à envisager pour identifier le gène associé au phénotype de la distorsion de la vacuole. Il serait judicieux de transférer des gènes de parasite *T. gondii* de type II, souche sensible à I2, dans la souche GT1 et en parallèle de transférer des gènes de GT1, souche non sensible à I2, dans des parasites de type II puis d'exposer les parasites au cours de leurs

infections au composé I2. Ainsi des parasites de souche de type II qui ont des gènes GT1 devraient devenir résistant à I2 et ne pas former une vacuole déformée et inversement pour la seconde transfection proposée. Ces manipulations à base de transfusions pourraient s'avérer pertinentes pour montrer l'induction du phénotype par le gène candidat. Un des premiers gènes à tester est naturellement *TGME-245530*, pour soit l'éliminer de l'étude ou pour soit persévérer dans l'investigation du rôle de ce gène en vue des résultats sur les SNP trouvés.

En l'état actuel de nos résultats, il est impossible de savoir pourquoi le parasite développe une vacuole déformée. La distorsion de la vacuole correspond-elle à une sorte de protection développée par le parasite, ou a-t-elle une fonction ou peut-elle être apparentée à une paroi kystique. Les résultats obtenus sur l'analyse des GRA exportés ne permettent pas d'affirmer cette hypothèse, car nous avons toujours observé une exportation des GRA alors que normalement les GRA ne sont plus exportés dans la phase kystique (Krishnamurthy S et Saeij JPJ, 2018). Cependant, nous pouvons développer l'hypothèse que sous traitement du composé I2, le parasite est dans une sorte de stade intermédiaire entre tachyzoïte et kystes/bradyzoïte. Il est important de ne pas oublier qu'il n'y a pas uniquement le parasite qui change lors d'une interconversion mais que la paroi de la vacuole se modifie aussi. Nous ne savons pas si l'osmolarité de la vacuole évolue en présence du composé I2, vu que la vacuole se gonfle de composé extérieur qui se retrouvent à l'intérieur de la vacuole alors qu'il ne devrait pas.

Nos observations sur les effets du composé I2 lors de l'infection de *T. gondii* renvoient à plusieurs questions pour lesquelles nous n'avons pas de réponse : le parasites *T. gondii* tire-t-il un bénéfice ou est-ce un désavantage pour lui-même de développer une vacuole déformée ? Est-ce que la vacuole s'accroît ou sa déformation était-elle la conséquence que la membrane de la vacuole devient très perméable au milieu extérieur et que la vacuole augmente de volume ? Un seul gène ou plusieurs gènes ou un complexe de protéines est (sont) il(s) impliqués dans le processus ? Est- ce un gène ou des gènes partenaires qui sont impliqués dans le phénotype observé chez les parasites GRA17 négatifs ? La majorité de ces questions trouverons une réponse dès qu'un gène (voir des gènes) sera identifié, même si cela n'empêche pas de continuer à caractériser plus finement la vacuole, ce qui peut éclairer sur des hypothèses et dans la sélection des gènes à investiguer. Il reste néanmoins intéressant de découvrir comment le parasite développe et acquiert des mécanismes au cours de son évolution et pour s'adapter à son environnement, car la mise en évidence de ces mécanismes ouvre à de nouvelles cibles thérapeutiques pour lutter contre le parasite et les conséquences de son infection.

Les travaux de ma thèse comprennent aussi l'étude du gène, *TGGT1-229480*. L'étude de ce gène a commencé par le partage de données entre deux laboratoires, le nôtre et celui de Jeroen Saeij. D'après le résultat de criblage effectué dans le laboratoire de Jeroen Saeij, le gène recherché pouvait être impliqué dans la fitness du parasite dans les cellules HFF, sans pour autant montré de phénotype précis pour l'IFN γ , et avoir un comportement similaire entre les HFF et les macrophages. Dans notre laboratoire nous avons des résultats similaires qui ont été obtenus en travaillant sur une souche différente. En reprenant ces données, avec de nouvelles expériences et en utilisant la même souche que pour le criblage nous avons constaté qu'effectivement les parasites délétés pour *TGGT1-229480* ont un défaut de croissance. Même si lors du criblage ce gène ressortait comme potentiellement impliqué dans la fitness du parasite, il est important de vérifier son rôle en l'éliminant du génome de parasite par délétion unique. En effet le criblage est fait à partir d'une bibliothèque de gRNA transfectés tous en même temps, ce qui implique des possibilités de doubles délétions de gènes chez un même parasite, et le pool de gRNA transfectés peut conduire à l'acquisition d'un phénotype, par un effet de compétition ou d'adaptation et peut s'avérer différent de celui qui serait observé par la délétion d'un gène unique. Il est à mentionner que certains phénotypes n'ont été pas confirmés par simple délétion d'un gène unique donné. Dans notre étude sur le gène *TGGT1-229480*, le résultat de défaut de croissance est vérifié et, cela par deux expériences différentes et indépendantes. Plus intéressant, nous avons mis en évidence un autre phénotype qui se résume en une légère résistance à un pré-traitement des cellules par IFN γ à faible dose. Les résultats préliminaires de notre équipe, de la relation de la protéine du gène *TGGT1-229480* avec les protéines TAB/TAK, n'ont pas pu être confirmés. Les résultats contradictoires peuvent s'expliquer par l'utilisation de la souche, qui dans la première expérience est du type II, (le type I a été utilisé dans la seconde) et aussi par la nature des cellules, RAW dans la première expérience puis HFF dans le second. Il serait intéressant de tester le type I dans des RAW et le type II dans les HFF, et de comparer tous les échantillons pour connaître les éventuelles interactions. Nous pouvons envisager que la protéine codée par le gène *TGGT1-229480* interagisse avec GRA15, car ce dernier active la voie NF κ B et de fait le complexe TAB/TAK. Pour rappel, GRA15 est inactif chez le type I lors des dernières expériences et ceci pourrait expliquer en partie la divergence de résultats. A noter qu'avec la technique de la masse spect, il est possible d'observer des protéines qui sont directement ou indirectement reliées au complexe. Il est par conséquent conseiller de refaire les expériences en incluant plus de contrôle, comme ceux cités ci-dessus, ce qui permettra de documenter l'étude du gène *TGGT1-229480*. Il n'est pas surprenant de constater une variation entre le type I et le type II, ce qui a déjà été démontré pour d'autres

GRA ou ROP, et tout simplement de constater des phénotypes complémentaires chez d'autres types de cellules. Par exemple il se peut que le gène ait des fonctions différentes dans les HFF et dans les macrophages, car ces deux types cellulaires sont très différents et n'ont pas les mêmes besoins « signalétiques », ou alors que les fonctions de ce gène soient différentes dans les différents règnes humains et animal. Pour toutes les raisons évoquées, le criblage par délétion a été retravaillé et amélioré et ceci en présence ou non d'IFN γ et en utilisant une batterie de différents types de cellules. Il est ainsi devenu possible d'identifier des gènes qui ont des fonctions spécifiques que dans certains types de cellules ou que dans certaines espèces ou de repérer des gènes impliqués dans les voies de signalisation de l'IFN γ et de sa résistance. Malheureusement, malgré nos efforts, il est difficile de conclure sur les fonctions de ce gène. Nous avons besoin d'établir des expériences complémentaires, comme par exemple de vérifier la résistance à l'IFN γ en mettant au point des essais de compétitions. Si ces essais fonctionnent, le parasite qui a un défaut de croissance devrait avoir un meilleur fitness que le parasite WT en cas de traitement à faible dose d'IFN γ . Par ailleurs des tests ont besoin d'être améliorés et calibrés en vue d'essais complémentaires de compétition car nous avons remarqué que, malheureusement les parasites marqués à la mcherry ont eux-mêmes un léger retard de croissance. Il est intéressant de noter que la délétion du gène TGGT1-229480 provoque chez le parasite un défaut de croissance et que cette même délétion lui est en quelque sorte bénéfique car le parasite a acquis une forme de résistance à l'IFN γ . Ceci atteste que le parasite *T. gondii* a une faculté surprenante de s'adapter et développer des mécanismes lui permettant d'assurer sa survie et ceci suscite aussi l'intérêt de déchiffrer l'ensemble des mécanismes mis en place, d'un part pour prédire les mécanismes que pourraient développer ce parasite en fonction de son environnement et des mécanismes de résistance aux traitements. Il nous semble judicieux d'étudier *T. gondii* dans différents environnements et d'étendre les études de crible par CRISPR-Cas9 sur des différents types de cellules de différentes espèces dans des contextes divers en utilisant des drogues afin d'identifier des gènes impliqués spécifiquement dans un environnement donné. L'ensemble de ces études permettra de dresser un inventaire sur les capacités d'adaptation du parasite avec ces différents hôtes et de dégager de potentiels cibles thérapeutiques pour contrôler sa transmission, contenir et limiter son cycle d'infection et éviter sa survie chez son hôte. En d'autres termes, parce que ce parasite a une grande capacité à envahir différents hôtes et à développer des mécanismes lui permettant de s'adapter, on se doit de continuer à investiguer le génome de ce parasite pour comprendre les mécanismes qu'il est capable de développer et ainsi contrecarrer son cycle d'infection de manière pertinente et éviter que ce parasite développe des résistances aux nouveaux traitements.

V. Matériel & Méthode

A. Culture cellulaire et parasites

Les cellules HFF (fibroblaste de prépuce humain), MEF (fibroblaste embryonnaires de souris) et Hela (épithélium lignées humaine) sont cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) complété avec 10% de sérum inactivé de veau fœtal (SVF), 10mM (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulphonic acid) (HEPES) buffer pH 7.2, 2 mM L-glutamine et 50 µg ml de penicillin/streptomycin. Les cellules sont placées en incubateur à 37°C avec 5% de CO₂. Ces différents lignages de cellules ont la capacité de former un tapis cellulaire par adhérence et inhibition de contact.

Les souches de *Toxoplasma gondii* de type I : GT1, RH, RH-ku80, RH-ku80-mCherry, RH-ku80-YFP et de type II : ME49, PRU-ku80 sont maintenues en culture *in vitro* en effectuant différents passages par l'intermédiaire des cellules HFF.

B. Anticorps et réactifs

Les anticorps primaires : Souris anti-HA (3F10, Roche), souris anti GRA1/GRA7 (proviennent de J.-F- Dubremetz, UMR 5235 Centre National de la Recherche Scientifique, Montpellier, France), lapin anti TAB1 (Cell signalling), lapin anti TAK1 (cell signalling) et lapin anti TBP (Abcam) sont utilisés pour l'immunofluorescence et pour les western blot. En ce qui concerne les anticorps secondaires, pour les analyses en western blot, un anticorps couplé à la phosphatase est utilisé, alors que pour l'immunofluorescence des anticorps couplés aux molécules Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 et Alexa Fluor 405 (Thermo Fisher Scientific) sont utilisés.

Les primers utilisés sont les suivants :

245530-CRISPR-FWD_1	AAGTTGCTGATTTGGTTTGCTGTAGG
245530-CRISPR-REV_1	AAAACCTACAGCAAACCAAATCAGCA
245530-REV-screen_1	CTACAGCAAACCAAATCAGC
245550-CRISPR-FWD_1	AAGTTGCCGCTCTTGTCACGCGTCTG
245550-CRISPR-REV_1	AAAACAGACGCGTGACAAGAGCGCGGA
245550-REV-screen_1	AGACGCGTGACAAGAGCGGC
245720-CRISPR-FWD_1	AAGTTGCGCGTCTGGTTCGCGTCGTGG
245720-CRISPR-REV_1	AAAACCACGACGCGACCAGACGCGCA
245720-REV-screen_1	CACGACGCGACCAGACGCGC
LIC-245530-FWD	TACTTCCAATCCAATTTAGCTGCAGATAACGAGAGACCACCCACGTG
LIC-245530-REV	TCCTCCACTTCCAATTTTAGCCTGTCGTCTCCCGTTCTCGTTCGAGTGTTTC
LIC-245550-FWD	TACTTCCAATCCAATTTAGCCGATCCGTTGCTTCGTCCAACACCTCG

LIC-245550-REV	TCCTCCACTTCCAATTTTAGCGGGAGCAAGACCAATTCAGCTCCGAGAG
LIC-245570 ORC2-FWD	TACTTCCAATCCAATTTAGCGGACTCACAAATCAGAATTGTTTC
LIC-245570 ORC2-REV	TCCTCCACTTCCAATTTTAGCGGATGCCGTACTGCTCCAGAATGGCG
ORC2-CRISP-FWD	AAGTTGTCGAGTTGGACTGGCTC
ORC2-CRISP-REV	AAAACCTCGAGCCAGTCCAACCTCGACA
ORC2-CRISP-screen	TCGAGCCAGTCCAACCTCGAC
TGGT1_229480-CRISPR-FWD	AAGTTGGGTGCGGTCTTCTTGCGCG
TGGT1_229480-CRISPR-REV	AAAACGCGCAAGGAAGACCGCACCCA
TGGT1_229480-CRISPR-screen	GCGCAAGGAAGACCGCACCC
LIC-TGGT1_229480_FWD	TACTTCCAATCCAATTTAGCTTCGACTGTCTCTCCGCACAGG
LIC-TGGT1_229480_REV	TCCTCCACTTCCAATTTAGCCAGTTCATCGTGTGTCTTCTCGTC
TGGT1_229480-FW	CCGAAAGTCTCTGCCCTTT
TGGT1_229480-REV	TGAAGCGTTGCTCGACTTCT
KO-TGGT1_229480-REV2	TTCAGCGTGTGCTCACTTGAGAG

C. Traitement avec la drogue I2

Les cellules HFF en confluences sont infectées par une des souches de *Toxoplasma gondii*, de type I : GT1, RH, RH-ku80, de type II : ME49, PRU-ku80 et des progénies (David Sibley) de manière indépendante pendant 24h à une MOI de 5. Dans le milieu de culture, la drogue I2 (molport) à 30 μ M est ajouté pendant environ 24 h. Les cellules sont ensuite soit récoltées pour des expériences en biochimie ou extraction, soit fixées pour des études en immunofluorescence.

D. Plasmide construction P-Lic et CrisprCas9

1. LIC

La génération de mutant transgénique stable a été faite à partir de marquage génique endogène. Consistant à amplifier par PCR le gène d'intérêt (GOI) à partir de l'ADN génomique de la souche de *toxoplasma gondii* souhaité, cet ADN sert de matrice pour les amorces pLIC-GOI_FW et pLIC-GOI_RV, dessiné spécifiquement pour le gène d'intérêt en limitant les variations entre les souches. Le produit de la PCR est ensuite inséré et cloné par transformation bactérienne dans le vecteur pLIC-HAFlag-dhfr (Bougdoor A *et al*, 2013) ou pLIC-mAID-HAFlag-dhfr (Sibley), en utilisant la méthode LIC décrit précédemment (Huynh MH et Carruthers VB, 2009) donnant ainsi respectivement pLIC-TgGOI-HA-DHFR ou pLIC-TgGOI-KD. L'utilisation du vecteur pLIC-TgGOI-KD se fait dans une souche spécifique RH-ku80-pRAUX-TIR1 ou PRU-ku80-pRAUX-TIR1, qui permet après induction par l'auxine la

dégradation du gène. Ce système permet d'induire l'inactivation de gène afin d'étudier des gènes essentiels pour le parasite.

2. CRISPR/Cas9

Le plasmide pTOXO_Cas9-CRISPR a été réalisé comme précédemment décrit (Curt-Varesano *et al*, 2016). Brièvement, les primers TgGOI-CRISP_FW et TgGOI-CRISP_RV contenant une séquence génomique ciblant l'ARNg sgR du GOI ont été phosphorylés, alignés et linéarisés dans le plasmide pTOXO_CAS9-CRISPR, puis linéarisé avec BsaI conduisant à pTOXO_CAS9_CRISPR Δ TgGOI.

E. Transfections

La transfection des souches de *Toxoplasma gondii* avec les vecteurs est réalisé par électroporation dans une solution tamponnée cytomix (120mM KCL, 0.15mM CaCL₂, 10mM K₂HPO₄ pH7.6, 25mM HEPES pH7.6, 2mM EGTA, 5mM MgCl₂). L'électroporation est réalisée en utilisant la machine BTX ECM 630 machine (Harvard Apparatus) et optimisée dans des cuvettes de 2mm à 1.100V, 25 Ω et 25 μ F. Les parasites transgéniques stables sont sélectionnés avec 1 μ M de pyriméthamine, puis un clone est isolé à partir de dilution limite dans des plaques 96 puits. La vérification des clones est faite soit par immunofluorescence soit par PCR.

F. Immunofluorescence

Des lamelles recouvertes d'un tapis cellulaire de HFF sont infectées avec *Toxoplasma gondii*. Par la suite ces lamelles seront fixées avec 3% de formaldéhyde pendant 20 min à RT ou fixées avec de l'éthanol -20°C pendant 5 min à RT, puis perméabilisées avec 0.1% Triton X-100 pendant 10 min à RT et les sites non-spécifiques sont saturés avec une solution de 3% de Bovine Serum Albumine (BSA) pendant 30min. Les lamelles sont incubées avec l'anticorps primaire pendant 1h à température ambiante puis en présence de l'anticorps secondaire couplé à une molécule fluorescente, ALEXaFLuor488, ALEXaFLuor594 et ALEXaFLuor405. In fine, les noyaux sont marqués pendant 10 min par du Hoechst 33258. Puis les lamelles sont montées sur des lames de glaces grâce à un milieu de montage le Mowiol. Les images sont recueillies par le microscope à Fluorescence AxioImager M2 équipé d'un module Apotome (Carl Zeiss, Inc.), et les images traitées par le logiciel Zen.

G. QTL mapping (quantitative trait loci)

Un QTL mapping est effectué comme décrit dans ces études de Sibley et Boothroyd (Behnke et al, 2011 ; Boyle et al, 2008) qui permet d'après un phénotype de vérifier si celui-ci est relié à une région précise du génome de *T. gondii*. Pour cela on utilise une data base résultant du croisement de deux souches de *T. gondii*, par exemple type I et type II, dans laquelle est spécifiée l'origine de toutes les séquences génomiques connues. Cette base permet de relier une séquence génomique à un phénotype soit positif soit négatif. Dans le cas où ce phénotype est relié à une particularité génomique d'une souche, cette séquence ressortira comme significative.

H. Extraction protéique de la cellule hôte

Les cellules HFF confluentes sont infectées par une souche d'intérêts de *Toxoplasma gondii*. Les cellules sont par la suite lavées avec du PBS1X puis la suspension cellulaire est centrifugée. Les culots sont ensuite repris dans un milieu tamponné d'extraction (Invitrogène) pendant 5min à 4°C. La lyse des cellules se fait par sonication en 10 cycles de 30s/30s. Les cellules sont centrifugées pour récupérer le surnageant.

I. Co-immuno précipitation des protéines du complexe Flag-tagué

Les cellules HFF à confluence sont infectées par des parasites exprimant la protéine endogène fusionnée avec le tag HA-Flag. Par la suite les cellules sont centrifugées puis le culot lavé avec du PBS1X-froid. Les cellules sont ensuite suspendues dans un milieu tamponné A (10 mM Tris-HCl, pH7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5mM DTT, 0.2 mM PMSF, 1X Roche inhibiteur de protéase). Les cellules sont lysées, pendant 8 min avec 0.1% NP40 suivi d'un broyage mécanique doux à l'aide de Potter pour rompre les membranes plasmatiques, puis sont centrifugées et la fraction cytosolique est récupéré. Cet extrait cytoplasmique est complété avec 1 :10th pour volume du milieu tamponné B à 10X (0.3 M Tris-HCl, pH7.9, 1.4M KCl, 0.03 M MgCl₂) avant l'incubation avec 50µL de FLAG M2 gel d'affinité (Sigma-Aldrich) pendant 1h à 4°C. Les billes sont lavées avec 3 fois avec du milieu BC500 (20 mM Tris-HCl, pH8.0, 0.5 M KCl, 20% Glycérol, 0.5 mM DTT, 0.5% NP40), puis l'élution est réalisée avec 50µL à 250µg/ml de peptide FLAG (sigma Aldrich) dilué dans du milieu tamponné BC100.

J. Analyse Immunoblotting (Western blot)

Les protéines extraites comme décrites précédemment sont séparées par un gel NuPage 4-12% Bis-tris polyacrylamide dans un milieu tamponné MES-SDS (Invitrogen) puis transférées sur

une membrane de polyvinylidene fluoride (PVDF) en utilisant le milieu tamponné de transfert NuPage (Invitrogen). La membrane est ensuite saturée pendant 1h avec une solution de lait à 5%, 0.01% Tween20 (w/v). Les anticorps primaires appropriés sont dilués dans du PBS 1X contenant 0.01% de Tween 20 (w/v) puis incubés 1h à RT. Les anticorps primaires sont détectés en utilisant des anticorps couplés à une phosphatase (Promega) ou avec le kit Supersignal West pico Chemiluminescent (Thermo Fisher Scientific).

K. Plages de lyses et traitement à l'IFN γ

Au fond de chaque puits d'une plaque 24 puits est placé une lamelle de 12mm recouverte d'un tapis de HFF qui est infecté par *T.gondii*. L'infection est réalisée en triplicata à une faible MOI, pendant 5 jours. Puis les cellules sont fixées et colorées par du Bleu de Coomassie pendant 30 min, puis montées en lame pour être observées au microscope. La plaque 24 puits peut aussi ne pas contenir de lamelles, dans ce cas la plaque sera fixée avec du bleu de Coomassie puis scannée. Chaque plage de lyse sera comptabilisée, une plage de lyse correspond à parasite. L'aire de chaque plage sera quantifiée à l'aide du microscope AxioImager M2 équipé d'un module Apotome (Carl Zeiss, Inc.) et du logiciel Zen (Carl Zeiss).

Dans le but de comparer la croissance et les effets de l'IFN γ , les cellules peuvent être prétraitées avant l'infection et pendant avec de l'IFN γ à plusieurs doses limites. Puis les cellules sont infectées et le même procédé décrit ci-dessus est effectué.

L. Test de compétition

Sur des cellules HFF confluentes les souches RH-ku80-mCherry et RH-ku80-YFP Δ TgGOI sont infectées avec un ratio de 1 :1. Puis à chaque lyse complète du tapis cellulaires 50 μ L de milieu est prélevé et dilué dans 1mL de PBS1X, ensuite la fluorescence de chaque parasite est analysée et quantifiée au cytomètre en Flux Accuri (BD Biosciences).

M. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel PRISM. En utilisant le test approprié pour chaque expérience, ANOVA ou T-test.

VI. Bibliographie

Adjogble KD, Mercier C, Dubremetz JF, Hucke C, Mackenzie CR, Cesbron-delauw MF et al. 2004. GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *Int J Parasitol* ; 34 (11) : 1255-64.

Ajzenberg, D.; Bañuls, A. L.; Su, C.; Dumètre, A.; Demar, M.; Carme, B. & Dardé, M. L. 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 34(10), 1185-1196

Ajzenberg, D.; Cogné, N.; Paris, L.; Bessières, M.-H.; Thulliez, P.; Filisetti, D.; Pelloux, H.; Marty, P. & Dardé, M.-L. 2002. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* 186(5), 684-689

Balaji S, Babu MM, Iyer LM, Aravind L. *Nucleic Acids Res.* 2005. Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains.; 33:3994-4006.

Behnke MS, Khan A, Wootton JC, Dubey JP, Tang K, and Sibley LD. 2011. Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7; 108(23): 9631–9636.

Black et Boothroyd, 2000 Black, M. W. & Boothroyd, J. C. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(3), 607-623.

Blanchard N, Gonzalez F, Schaeffer M, Joncker NT, Cheng T, Shastri AJ, Robey EA, Shastri N. 2008. Immunodominant, protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* 9:937–944. 10.1038/ni.1629.

Bliss SK, Butcher BA, Denkers EY. 2000. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. *J Immunol* ; 165 (8) : 4515-21.

Bohne W, Heesemann J, Gross U. 1994. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect Immun*; 62(5):1761-7.

Bohne W, Heesemann J, Gross. 1993. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infect Immun*; 61(3):1141-5.

Boothroyd JC et Dubremetz JF .2008. Kiss ans spit : the dual roles of toxoplasma rhoptries. *Nature reviews. Microbiology* 6 :79-88

Boothroyd, J. C. & Grigg, M. E. 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease?, *Curr Opin Microbiol* 5(4), 438-442.

Bougdour A, Braun L, Cannella D, Hakimi M-A. *Cell Microbiol.* 2010. Chromatin modifications: implications in the regulation of gene expression in *Toxoplasma gondii*.; 12:413-423.

Bougdour A, Durandau E, Brenier-Pinchart MP, Ortet P, Bakarar 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 alter gene expression. *Cell host & microbe* 13 :489-500

Bougdour A, Maubon D, Baldacci P, et al. 2009. Drug inhibition of HDAC3 and epigenetic control of differentiation in Apicomplexa parasites. *J Exp Med*; 206(4):953–966.

Boyle JP, Saeij JP, Cleary MD, Boothroyd JC. 2006. Analysis of gene expression during development: lessons from the Apicomplexa. *Microbes Infect*; 8(6):1623–1630.

- Boyle JP, Saeij JPI, Harada SY, Ajioka JW, Boothroyd JC. 2008. Expression Quantitative Trait Locus Mapping of *Toxoplasma* Genes Reveals Multiple Mechanisms for Strain-Specific Differences in Gene Expression. *EUKARYOTIC CELL*, p. 1403–1414
- Braun L, Brenier-Pinchart M-P, Yogavel M, Curt-Varesano A, Curt-Bertini R-L, Hussain T, et al. 2013. A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation. *J Exp Med*. 210:2071-2086
- Carey N, La Thangue NB. 2006. Histone deacetylase inhibitors: gathering pace. *Curr Opin Pharmacol*;6(4):369–375.
- Carme, B.; Ajzenberg, D.; Demar, M.; Simon, S.; Dardé, M. L.; Maubert, B. & de Thoisy, B. 2009. Outbreaks of toxoplasmosis in a captive breeding colony of squirrel monkeys. *Vet Parasitol* 163(1-2), 132-135.
- Carme, B.; Bissuel, F.; Ajzenberg, D.; Bouyne, R.; Aznar, C.; Demar, M.; Bichat, S.; Louvel, D.; Bourbigot, A. M.; Peneau, C.; Neron, P. & Dardé, M. L. 2002. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J Clin Microbiol* 40(11), 4037-4044.
- Carruthers VB. 2002. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop* ; 81 (2) : 111-22.
- Castonguay E, White SA, Kagansky A, St-Cyr DJ, Castillo AG, Brugger C, White R, Bonilla C, Spitzer M, Earnshaw WC, Schalch T, Ekwall K, Tyers M, Allshire RC. 2015. Panspecies small-molecule disruptors of heterochromatin-mediated transcriptional gene silencing. *Mol Cell Biol* 35:662– 674.
- Cha DY, Song IK, Lee GS, Hwang OS, Noh HJ, Yeo SD et al. 2001. Effects of specific monoclonal antibodies to dense granular proteins on the invasion of *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo. *Korean J Parasitol* ; 39 (3) : 233-40.
- Cleary MD, Singh U, Blader IJ, Brewer JL, Boothroyd JC. 2002. *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. *Eukaryot Cell*. ; 1:329-340.
- Conrad, P. A.; Miller, M. A.; Kreuder, C.; James, E. R.; Mazet, J.; Dabritz, H.; Jessup, D. A.; Gulland, F. & Grigg, M. E. 2005. Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *Int J Parasitol* 35(11-12), 1155-1168.
- Dalmaso MC, Echeverria PC, Zappia MP, Hellman U, Dubremetz JF, Angel SO. 2006. *Toxoplasma gondii* has two lineages of histones 2b (H2B) with different expression profiles. 2006;148(1):103–107.
- Dalmaso MC, Sullivan WJ, Jr, Angel SO. 2012. Canonical and variant histones of protozoan parasites. State of knowledge about canonical and variant histones of protozoan parasites like *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* based on literature and database searching. *Front Biosci*. ;17:2086–2105
- Dardé, M. L.; Bouteille, B. & Pestre-Alexandre, M. 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J Parasitol* 78(5), 786-794.
- Darkin–Ratray SJ, Gurnett AM, Myers RW, et al. 1996. Apicidin: a novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci USA*;93(23):13143–13147.
- De Lay, N.R., Cronan, J.E., 2007. In vivo functional analyses of the type II acyl carrier proteins of fatty acid biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 282, 20319-20328.
- Demar, M.; Ajzenberg, D.; Maubon, D.; Djossou, F.; Panchoe, D.; Punwasi, W.; Valery, N.; Peneau, C.; Daigre, J.-L.; Aznar, C.; Cottrelle, B.; Terzan, L.; Dardé, M.-L. & Carme, B. 2007. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin Infect Dis* 45(7), e88-e95.
- Demar, M.; Ajzenberg, D.; Serrurier, B.; Dardé, M. L. & Carme, B. 2008. Atypical *Toxoplasma gondii* strain from a free-living jaguar (*Panthera onca*) in French Guiana. *Am J Trop Med Hyg* 78(2), 195-197.

- Denkers EY, Del rio L, Bennouna S.2003.Neutrophil production of IL-12 and other cytokines during microbial infection.Chem Immunol Allergy ; 83 : 95-114.
- Denkers EY.2003. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*.FEMS ; 1633 : 1-11.
- Denton, H., Roberts, C. W., Alexander, J., Thong, K. W., and Coombs, G. H.1996. Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. FEMS Microbiol.Lett. 137(1): 103-108.
- Desmonts, G. & Couvreur, J. 1965. Epidemiological study on toxoplasmosis: the influence of cooking slaughter-animal meat on the incidence of human infection. Rev Fr Etud Clin Biol 10(9), 952-958.
- Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Parasitology. 2012. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology.139:1375-424.
- Dubey, J. P. 2008. The history of *Toxoplasma gondii*—the first 100 years. J Eukaryot Microbiol 55(6), 467-475
- Dubey, J. P.; Lindsay, D. S. & Speer, C. A. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Re v11(2), 267-299.
- Dubey, J. P.; Miller, N. L. & Frenkel, J. K. 1970. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. J Am Vet Med Assoc 157(11), 1767-1770.
- Dubey, J. P.; Sundar, N.; Hill, D.; Velmurugan, G. V.; Bandini, L. A.; Kwok, O. C. H.;Ferguson, D. J. and Hutchison, W. M. 1987 An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. Parasitol.Res. 73(6): 483-491.
- Duquesne V, Auriault C, Gras-Masse H, Boutillon C, Darcy F, Cesbron-Delauw MF, Tartar A, Capron A. 1991. Identification of T cell epitopes within a 23-kD antigen (P24) of *Toxoplasma gondii*. Clin. Exp. Immunol. 84:527–534.
- Fichera, M.E., Roos, D.S., 1997. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. Nature 390, 407-409.
- Frenkel, J. K. 1973. *Toxoplasma* in and around us. BioScience 23, 343-352. Fuentes, I.; Rubio, J. M.; Ramírez, C. & Alvar, J. (2001), Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. J Clin Microbiol 39(4), 1566-1570.
- Frenkel, J. K.; Dubey, J. P. & Miller, N. L. 1969. *Toxoplasma gondii*: fecal forms separated from eggs of the nematode *Toxocara cati*. Science 164(878), 432-433.
- Frickel EM, Sahoo N, Hopp J, Gubbels MJ, Craver MP, Knoll LJ, Ploegh HL, Grotenbreg GM. 2008. Parasite stage-specific recognition of endogenous *Toxoplasma gondii*-derived CD8+ T cell epitopes. J. Infect. Dis. 198:1625–1633. 10.1086/593019.
- Fritz HM, Buchholz KR, Chen X, Durbin-Johnson B, Rocke DM, Conrad PA, et al. 2012. Transcriptomic analysis of *Toxoplasma* development reveals many novel functions and structures specific to sporozoites and oocysts. PloS One; 7:e29998.
- Furtado JM, Smith JR, Belfort Jr R, Gattey D, Winthrop KL. Journal of Global Infectious Diseases. 2011,Toxoplasmosis: a global threat. 3: 281.
- Gazzinelli R, Hieny S, Wynn T, Wolf S, Sher A. 1993. Interleukin-12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of Interferon- γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts.Proc Natl Acad Sci USA ; 90 : 6115-19.
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P et al.1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*.J Immunol ; 153 (6) : 2533-43.

- Gold DA, Kaplan AD, Bett GC, Rosowski EE, Cirelli KM, Bougdour A, Sidik SM, Beck JR, Laurido S, Egea PF, Bradley PJ, Hakimi MA, Rasmusson RL, Saeij JP. 2015. The *Toxoplasma dense* granule proteins GRA17 and GR23 mediate the movement of small molecules between the host and the parasitophorous vacuole. *Cell Host Microbe*. 13;17(5):642-52
- Gordon, J.L., Beatty, W.L., Sibley, L.D., 2008. A novel actin-related protein is associated with daughter cell formation in *Toxoplasma*. *Eukaryotic cell*.
- Gregoret IV, Lee YM, Goodson HV. 2004. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol*;338(1):17–31.
- Gross, U.; Kempf, M. C.; Seeber, F.; Lüder, C. G.; Lugert, R. & Bohne, W. 1997. Reactivation of chronic toxoplasmosis: is there a link to strain-specific differences in the parasite?, *Behring Inst Mitt*(99), 97-106
- Guarente L. 2000. Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev.*;14(9):1021–1026.
- Gurnett AM, Liberator PA, Dulski PM, Salowe SP, Donald RG, Anderson JW, Wiltsie J, Diaz CA, Harris G, Chang B, Darkin-Rattray SJ, Nare B, Crumley T, Blum PS, Misura AS, Tamas T, Sardana MK, Yuan J, Biftu T, Schmatz DM. 2002. Purification and molecular characterization of cGMP-dependent protein kinase from Apicomplexan parasites. A novel chemotherapeutic target. *J Biol Chem*.3; 277(18):15913-22.
- Hayashi, S., C. C. Chan, R. Gazzinelli, and F. G. Roberge. 1996. Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis. *J Immunol* 156:1476-1481.
- Herrmann DC, Bärwald A, Maksimov A, Pantchev N, Vrhovec MG, Conraths FJ, and Schares G. 2012. *Toxoplasma gondii* sexual cross in a single naturally infected feline host: Generation of highly mouse-virulent and avirulent clones, genotypically different from clonal types I, II and III. *Vet Res*; 43(1): 39.
- Howe, D. K. & Sibley, L. D. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*172(6), 1561-1566.
- Howe, D. K.; Honoré, S.; Derouin, F. & Sibley, L. D. 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*35(6),1411-1414.
- Hunter CA, Remington JS.1995. The role of IL-12 in toxoplasmosis. *Res Immunol* ; 146 (7-8) : 546-52.
- Hutchison, W. M. 1965. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*206(987),961-962.
- Huynh MH, Carruthers VB. 2009 Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain lacking Ku80. *Eukaryot Cell*; 8(4):530-9.
- Iyer LM, Anantharaman V, Wolf MY, Aravind L. 2008. Comparative genomics of transcription factors and chromatin proteins in parasitic protists and other eukaryotes. *Int J Parasitol.* ; 38:1-31.
- Jerome ME, Radke JR, Bohne W, Roos DS, White MW. 1998. *Toxoplasma gondii* bradyzoites form spontaneously during sporozoite-initiated development. *Infect Immun*;66(10):4838–4844.
- Kasper L, Courret N, Darche S, Luangsay S, Mennechet F, Minns L et al.2004.*Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. *Int J Parasitol* ; 34 (3) : 401-9.
- Khan, A.; Su, C.; German, M.; Storch, G. A.; Clifford, D. B. & Sibley, L. D. 2005. 257 Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *J Clin Microbiol*43(12), 5881-5887.
- Krishnamurthy S and Saeij JPI. 2018. *Toxoplasma* does not secrete the GRA16 and GRA24 effectors beyond the parasitophorous vacuole membrane of tissue cyst. *Front Cell Infect Microbiol.* 18;8:366
- Lyons, R. E., McLeod, R., and Roberts, C. W.2002. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol.*18(5): 198-201.

- Mackay CR Chemokines: immunology's high impact factors.2001. Nat Immunol ; (2) 2 : 95–101.
- Majumdar, D. & Su, C. 2008. High prevalence and abundant atypical genotypes of
- Maubon D, Bougdour A, Wong YS, et al. 2010. Activity of the histone deacetylase inhibitor FR235222 on *Toxoplasma gondii*: inhibition of stage conversion of the parasite cyst form and study of new derivative compounds. Antimicrob Agents Chemother;54(11):4843–4850.
- Meissner, M.; Reiss, M.; Viebig, N.; Carruthers, V. B.; Toursel, C.; Tomavo, S.; Ajioka, J. W. & Soldati, D. 2002. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. J Cell Sci115(Pt 3), 563-574.
- Mercier C, Adjogble KDZ, Däubener W, Delauw M-F-C. 2005. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? Int J Parasitol.; 35:829-849.
- 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. Mol Biol Cell ; 13 (7) : 2397-409.
- Mercier, A.; Devillard, S.; Ngoubangoye, B.; Bonnabau, H.; Bañuls, A. L.; Durand, P.; Salle, B.; Ajzenberg, D. & Dardé, M. L. 2010. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon, PLoS Negl Trop Dis.4(11), e876.
- Messina DN, Glasscock J, Grish W, Lavett M. 2004. An ORFeome-based analysis of human transcription factor genes and the construction of a microarray to interrogate their expression. Enome research. 14, 2041-2047
- Miller CM, Smith NC, Johnson. 1999.AM.Parasitol Cytokines, nitric oxide, heat shock proteins and virulence in *Toxoplasma*.Parasitol Today ; 10 : 418-22
- Miller, M. A.; Grigg, M. E.; Kreuder, C.; James, E. R.; Melli, A. C.; Crosbie, P. R.; Jessup, D. A.; Boothroyd, J. C.; Brownstein, D. & Conrad, P. A. 2004. An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. Int J Parasitol34(3), 275-284.
- Nam H-W. 2009. GRA proteins of *Toxoplasma gondii* : maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. Korean J Parasitol. 47 suppl:S29-37
- Nare B, Allocco JJ, Liberator PA, Donald RG. 2002. Evaluation of a cyclic GMP-dependent protein kinase inhibitor in treatment of murine toxoplasmosis: gamma interferon is required for efficacy. Antimicrob Agents Chemother; 46(2):300-7.
- Nicolle, C. & Manceaux, L. 1908. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences.147, 763-766.
- Nicolle, C. & Manceaux, L. 1909., Sur un protozoaire nouveau du gondi. Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences.148, 369-372.
- Noh JH, Jung KH, Kim JK, et al. 2011. Aberrant regulation of HDAC2 mediates proliferation of hepatocellular carcinoma cells by deregulating expression of G1/S cell cycle proteins. PLoS ONE;6(11):e28103.
- Oakley, M.S., Kumar, S., Anantharaman, V., Zheng, H., Mahajan, B., Haynes, J.D., Moch, J.K., Fairhurst, R., McCutchan, T.F., Aravind, L., 2007. Molecular factors and 136 biochemical pathways induced by febrile temperature in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* parasites. Infection and immunity 75, 2012-2025. Parasitol 38(8-9), 999-1006.
- Pittman KJ, Aliota MT et Knoll LJ. 2014. Dual transcriptional profiling of mice and *Toxoplasma gondii* during acute and chronic infection. BMC Genomic; 15(1):806

- Radke JR, Behnke MS, Mackey AJ, Radke JB, Roos DS, White MW. BMC Biol. 2005. The transcriptome of *Toxoplasma gondii*.; 3:26.
- Radke JR, Donald RG, Eibs A, Jerome ME, Behnke MS, Liberator P, White MW. 2006. Changes in the expression of human cell division autoantigen-1 influence *Toxoplasma gondii* growth and development. PLoS Pathog; 2(10):e105.
- Rangwala S, Zhang C, Duvic M. 2012. HDAC inhibitors for the treatment of cutaneous T-cell lymphomas. Future Med Chem;4(4):471–486.
- Reikvam, A. & Lorentzen-Styr, A. M. 1976. Virulence of different strains of *Toxoplasma gondii* and host response in mice, Nature261(5560), 508-509.
- Richomme, C.; Aubert, D.; Gilot-Fromont, E.; Ajzenberg, D.; Mercier, A.; Ducrot, C.; Ferté, H.; Delorme, D. & Villena, I. 2009. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. Vet Parasitol164(2-4), 296-300.
- Saavedra R, de Meuter F, Decourt JL, Herion P. 1991. Human T cell clone identifies a potentially protective 54-kDa protein antigen of *Toxoplasma gondii* cloned and expressed in *Escherichia coli*. J. Immunol. 147:1975–1982.
- Saeij JP, Boyle JP, Boothroyd. 2005. Differences among the three major strains of *toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. Trends in parasitology 21 :476-481
- 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
- Saksouk N, Bhatti MM, Kieffer S, Smith AT, Musset K, Garin J, et al. 2005. Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Mol Cell Biol.; 25:10301-10314.
- Sautel CF, Cannella D, Bastien O, Kieffer S, Aldebert D, Garin J, et al. 2007. SET8-mediated methylations of histone H4 lysine 20 mark silent heterochromatic domains in apicomplexan genomes. Mol Cell Biol; 27:5711-5724.
- Sayles P, Gibson G, Johnson L. 2000. B cells are essential for vaccination induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. Infect Immunol ; 68 : 1026-33.
- Sheiner L, Santos JM, Klages N, Parussini, Jemmely N, Friedrich N, Ward GE, Soldati-Favre D. 2010. *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. Molecular microbiology.
- Sher A, Reis E Sousa C. 1998. Ignition of the type 1 response to intracellular infection by dendritic cell derived interleukin-12. Eur Cytok Netw ; 9 (3) : 65-8.
- Sibley LD, Adams LB, Fukutomi Y, Krahenbuhl JL. 1991. Tumor Necrosis Factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages. J Immunol ; 147 (7) : 2340-5.
- Sibley, L. D. & Boothroyd, J. C. 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. Nature359(6390), 82-85.
- Sidik SM, Huet D, Gasenan SM, Huynh MH, Wang T, Nasamu A, Thiru A, Saeij JPI, Carruthers VB, Niles JC, Lourido S. 2016. A genom-wide CRISPR Screen in *Toxoplasma* Identifies essential Apicomplexan genes. Cell. 167, 1-13
- Singh U, Brewer JL, Boothroyd JC. Mol Microbiol. 2002. Genetic analysis of tachyzoite to bradyzoite differentiation mutants in *Toxoplasma gondii* reveals a hierarchy of gene induction; 44:721-733.
- Soète M, Camus D, Dubremetz JF. 1994. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro. Exp Parasitol.; 78(4):361-70.

- Soete M, Fortier B, Camus D, Dubremetz JF. 1993. *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro. *Exp Parasitol*.76(3):259-64.
- Splendor, A. 1908. Un nuovo protozoa parassita de conigli., *Revista da Sociedade Scientifica de Sao Paulo*3, 109-112.
- Strobl JS, Cassell M, Mitchell SM, Reilly CM, Lindsay DS. 2007. Scriptaid and suberoylanilide hydroxamic acid are histone deacetylase inhibitors with potent anti-*Toxoplasma gondii* activity *in vitro*. *J Parasitol*. ;93(3):694–700.
- Sturge CR, Benson A, Raetz M, Wilhelm CL, Mirpuri J, Vitetta ES, Yarovinsky F. 2013. TLR-independent neutrophil-derived IFN- γ is important for host resistance to intracellular pathogens. *Proc Natl Acad* ; 110(26):1017-6.
- 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
- Su et al 2002 Su, C.; Howe, D. K.; Dubey, J. P.; Ajioka, J. W. & Sibley, L. D. (2002), Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci US A*99(16), 10753-10758
- Subauste CS, Fuh F, DE Waal Malefyt R, Remington J.1998. α/β T cell response to *Toxoplasma gondii* in previously unexposed individuals.*J Immunol* (a) ; 160 (7) : 3403-11.
- Sullivan WJ, Hakimi M-A. 2006. Histone mediated gene activation in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.*; 148:109-116.
- Suzuki Y, Remington JS.1988.Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2+ and Lyt-1+,L3T4+ T cells in mice.*J Immunol* ; 140 (11) : 3943-6.
- Suzuki, Y.; Conley, F. K. & Remington, J. S.1990. Treatment of toxoplasmic encephalitis in mice with recombinant gamma interferon. *Infect Immun*58(9), 3050-3055.
- Taylor GA. 2007. IRG proteins : key mediators of interferon-regulated host resistance to intracellular pathogens. *Cellular microbiology* 9 :1099-1107
- Templeton, T. J., Iyer, L. M., Anantharaman, V., Enomoto, S., Abrahante, J. E., Subramanian, G. M., Hoffman, S. L., Abrahamsen, M. S., and Aravind, L. 2004 Comparative analysis of apicomplexa and genomic diversity in eukaryotes.*Genome Res.* 14(9): 1686-1695.
- Tyebji S, Seizova S, Hannan AJ, Tonkin CJ. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2019, *Toxoplasmosis: A pathway to neuropsychiatric disorders*. 96:72-92.
- Vinayak S, Brooks CF, Naumov A, Suvorova ES, White MW, and Striepen B. 2014. Genetic Manipulation of the *Toxoplasma gondii* Genome by Fosmid Recombineering. *mBio*; 5(6): e02021-14.
- Wang X, Claflin J, Kang H, Suzuki Y. 2005. Importance of CD8(+)Vbeta8(+) T cells in IFN-gamma-mediated prevention of toxoplasmic encephalitis in genetically resistant BALB/c mice. *J. Interferon Cytokine Res.* 25:338–344. 10.1089/jir.2005.25.338.
- Weiss LM, Laplace D, Takvorian PM, Tanowitz HB, Cali A, Wittner M. 1995. A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites.*J Eukaryot Microbiol*; 42(2):150-7.
- Wilson, R.J., Williamson, D.H., 1997. Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa.*Microbiol Mol Biol Rev* 61, 1-16.
- Wolf, A.; Cowen, D. & Paige, B. 1939. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. *Science*89, 226-227.

Xargay-Torrent S, López-Guerra M, Saborit-Villarroya I, et al. 2011. Vorinostat-induced apoptosis in mantle cell lymphoma is mediated by acetylation of proapoptotic BH3-only gene promoters. *Clin Cancer Res*;17(12):3956–3968.

Xu K, Dai XL, Huang HC, Jiang ZF. 2011. Targeting HDACs: a promising therapy for Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev* ;2011:143269

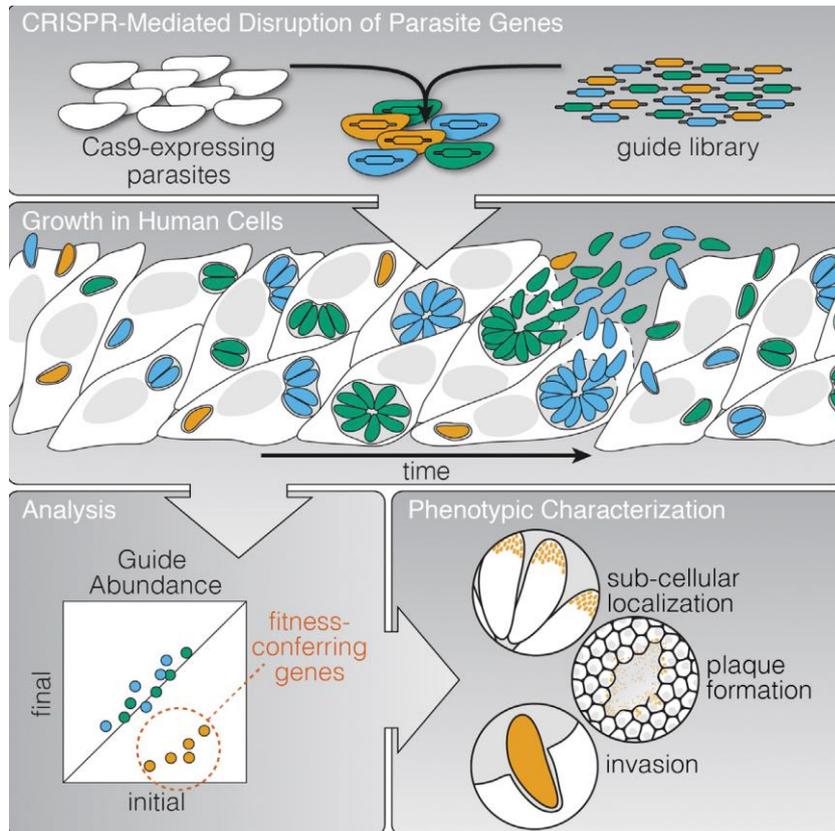
Yang N , Farrell A , Niedelman W, Melo M, Lu D, Julien L, Marth GT, Gubbels MJ and Saeij JPJ.2013. Genetic basis for phenotypic differences between different *Toxoplasma gondii* type I strains. *BMC Genomics*, 14:467

Yap G, Pesin M, Sher A.2000.Cutting edge: IL-12 required for the maintenance of IFN- γ production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*.*J Immunol* 2000 ; 165 (2) : 628-31.

Yap, G. S., and A. Sher. 1999. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. *Immunobiology* 201:240-247.

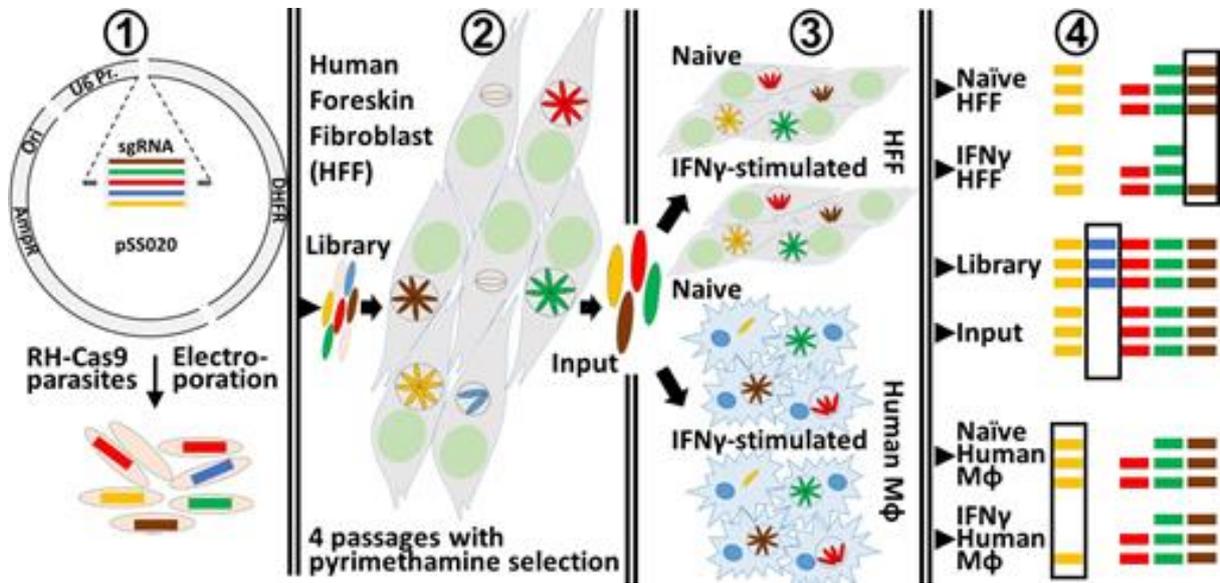
Annexes

Annexe 1:



Schema de la méthode du crible réalisé par le laboratoire de Sebastian Lourido. Copyright Sidik et al, Cell, 2016.

Annexe 2:



*Schéma de la méthode du criblage perfectionné dans le laboratoire de Jeroen Saeij. Identification des gènes de *T. Gondii* qui détermine sa survie dans des cellules humaine stimulé à l'IFN γ*

- 1) RH-Cas9 parasites are electroporated with plasmids representing a gRNA library targeting all *Toxoplasma* genes. 2) Passages in HFFs under pyrimethamine selection will remove parasites containing gRNAs targeting essential genes and non-transfected parasites. 3) Naïve or IFN γ -stimulated HFFs or macrophages, are infected with the pool of mutant parasites. Parasites are passaged 3 times in these cells. 4) The difference in abundance of gRNAs targeting a gene is compared between samples: immediately after electroporation (library), after 3-4 passages through unstimulated HFFs (input), and after 3 passages through IFN γ -stimulated or naïve cells.

Résumé

Toxoplasma gondii est un parasite protozoaire intracellulaire obligatoire, et est l'agent responsable de la toxoplasmose, une parasitose habituellement bénigne chez le sujet immunocompétent ou en dehors d'une grossesse. Lorsqu'elle est congénitale, la toxoplasmose peut se manifester par de malformations neurologiques sévères. Cette maladie se développe sous deux formes. La première comprend la phase aigüe provoquée par l'expansion de la population de tachyzoïtes qui peuvent provoquer des malformations chez le fœtus. La seconde est dite chronique et asymptomatique, le bradyzoïte est y présent sous forme de kystes. Une réactivation des bradyzoïtes en tachyzoïtes peut être fatale pour les patients immunodéprimés. L'interconversion tachyzoïte-bradyzoïte est donc au centre de la pathogénèse de cette zoonose. L'interconversion est régulée au niveau transcriptionnel, avec un contrôle épigénétique strict. *In vitro*, il a été montré que l'inhibition de l'histone déacétylase TgHDAC3 par FR235222 induit la conversion. Dans cette thèse, nous avons étudiés un nouveau composé I2, ayant des propriétés agissant également sur les HDACs. Nous démontrons que ce composé inhibe la croissance chez toutes les souches de *T. gondii*, sans pour autant induire la différenciation tachyzoïte-bradyzoïte. Par contre, le composé I2 induit une déformation de la vacuole, qui prend l'apparence d'une bulle, uniquement chez certaines souches de *T. gondii*. D'après les expériences effectuées la distorsion de la vacuole n'interfère ne s'apparente pas à une paroi kystique. Un criblage génétique a permis de définir une région génomique responsable du phénotype « bulle » de la vacuole. En l'état actuel le gène responsable reste à être identifié ainsi que les mécanismes qui participent à la distorsion de la vacuole. Parallèlement, un autre projet a été initié sur la base d'une étude de gènes impliqués dans la croissance et/ou dans la résistance à l'IFN γ , cytokine principale de défense contre le parasite. Un gène a été étudié. La délétion de ce celui-ci chez le parasite provoque un défaut de croissance et de manière surprenante une résistance à un traitement à l'IFN γ . Ce gène et son mode de fonctionnement restent à être étudié. Ensemble, ces travaux nous montrent une adaptation de *T. gondii* à son environnement et le développement de mécanismes de survie qui restent à être élucidés.

Summary

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan parasite, and is the causative agent of toxoplasmosis, a benign parasitosis in immunocompetent or non-pregnant subjects. When congenital, toxoplasmosis can manifest as severe neurological malformations. This disease develops in two forms. The first includes the phase caused by the rise of the population of tachyzoites that can cause malformations in the fetus. The second is chronic and asymptomatic, bradyzoite is in the form of cysts. Reactivation of bradyzoites into tachyzoites may be fatal for immunocompromised patients. Tachyzoite-bradyzoite interconversion is therefore at the center of the pathogenesis of this zoonosis. Interconversion is regulated at the transcriptional level, with strict epigenetic control. *In vitro*, inhibition of histone deacetylase TgHDAC3 by FR235222 has been shown to induce conversion. In this thesis, we have studied a new compound I2, with properties that also act on HDACs. We demonstrate that this compound inhibits growth in all *T. gondii* strains, but does not induce tachyzoite-bradyzoite differentiation. On the other hand, the compound I2 induces a deformation of the vacuole, which takes the appearance of a bubble, only in certain strains of *T. gondii*. From the experiments carried out the distortion of the vacuole does not interfere with a cystic wall. Genetic screening has defined a genomic region responsible for the bubble phenotype of the vacuole. In the current state the responsible gene remains to be identified as well as the mechanisms that participate in the distortion of the vacuole. In parallel, another project was initiated on the basis of a study of genes involved in the growth and / or resistance to IFN γ , the main cytokine of defense against the parasite. A gene has been studied. The deletion of this one in the parasite causes a growth defect and, surprisingly, resistance to treatment with IFN γ . This gene and its mode of operation remain to be studied. Together, these works show us an adaptation of *T. gondii* to its environment and the development of mechanisms of survival that remain to be elucidated.