



HAL
open science

Étude des interactions hôte-pathogène et nouvelles pistes thérapeutiques chez *Theileria annulata*

Marie Villares

► **To cite this version:**

Marie Villares. Étude des interactions hôte-pathogène et nouvelles pistes thérapeutiques chez *Theileria annulata*. Biologie cellulaire. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP7370 . tel-04187081

HAL Id: tel-04187081

<https://theses.hal.science/tel-04187081>

Submitted on 24 Aug 2023

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 de doctorat de l'Université de Paris
En Biologie Moléculaire et Cellulaire

École doctorale BioSPC 562

*Laboratoire de Plasticité des phénotypes cellulaires
Unité d'Épigénétique et Destin Cellulaire*

Étude des interactions hôte-pathogène et
nouvelles pistes thérapeutiques chez
Theileria annulata

Par **Marie Villares**

Dirigée par le Pr. **Jonathan Weitzman**

Présentée et soutenue publiquement à Paris, le 16 Décembre 2021

Président du jury : Pr. Fernando Rodrigues-Lima

Rapporteurs : Dr. Lucile Espert, Université de Montpellier
Dr. Mohammed Ali Hakimi, Université Grenoble Alpes

Examineurs : Dr. Etienne Morel, Université de Paris
Pr. Fabienne Malagnac, Université Paris Saclay

Membre invité : Dr. Flore Nardella, Institut Pasteur

Directeur de thèse : Pr. Jonathan Weitzman

**« Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté.
Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est
aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent
comme des contes de fées. »**

Marie Curie
Physicienne, Scientifique (1867 - 1934)

Remerciements

Par où commencer ? Enfin, plutôt par qui ? J'ai eu la chance d'être extrêmement bien entourée et soutenue durant ces 3 dernières années, ce qui m'a permis de ne jamais baisser les bras et de pouvoir aujourd'hui présenter mon travail.

J'espère n'oublier personne et que ma gratitude envers vous tous transparaîtra dans ces quelques lignes.

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Un grand merci au Dr. Lucile Espert et Dr. Mohammed Ali Hakimi pour l'examen de mon manuscrit en tant que rapporteurs ; merci également au Pr. Fabienne Malagnac et au Dr. Etienne Morel pour leur participation en tant qu'examinateurs. Merci particulièrement à Etienne et Lucile, à qui j'ai présenté mes travaux et qui ont su me guider dans un domaine loin de l'expertise du laboratoire. Merci au Dr Flore Nardella, d'avoir accepté mon invitation, et au Dr Paola Arimondo, pour leur aide au cours de ma thèse. Enfin, merci au Professeur Fernando Rodrigues-Lima, de présider ce jury de thèse et pour votre sympathie à chacune de mes visites à BFA.

Je remercie également la région Ile de France, l'école Doctorale BioSPC, l'Unité d'Épigénétique et Destin Cellulaire, et enfin le laboratoire de Plasticité des phénotypes cellulaires dirigé par le Professeur Jonathan Weitzman. Je ne pense pas que cela soit donné à tous les étudiants en thèse de pouvoir s'épanouir durant leurs recherches dans un environnement si accueillant, bienveillant et de partage. J'ai eu la chance de connaître cela au sein de l'UMR7216, et je tiens à remercier nos directrices Mesdames Valérie Mezger et Claire Rougeulle de faire perdurer cette ambiance de travail saine et si agréable, permettant à chacun de trouver sa place et de s'exprimer. Merci à toutes les personnes de l'Unité, qui participent à la bonne humeur, et au rayonnement de cette UMR tant sur le plan professionnel que social : merci à l'équipe des Mezger, des PAD, des Rougeulle, des Polo, des Francastel et des Ait-si-ali. Merci aussi à Ingrid, notre super gestionnaire, pour t'être si bien occupée de moi.

Je n'aurais pas eu la chance de faire cette thèse sans le Professeur Jonathan Weitzman. Dès le premier cours que vous avez donné au Magistère Européen de Génétique, j'ai su que je voulais travailler avec vous, « coûte que coûte ».

Bien qu'avertie sur la nécessité d'être autonome (face à votre emploi du temps pour 8 personnes), vous avez tout de même su trouver du temps pour moi, pour « mon projet » (je sais que vous n'aimez pas que je dise ça) et pour me faire grandir en tant que jeune scientifique. Je pense qu'une réelle complicité est née de notre collaboration, j'ai un profond respect et une grande admiration pour le scientifique que vous êtes, mais aussi pour l'excellent orateur, qui sait transmettre sa passion et sa vision des choses mieux que quiconque. Je vous remercie aussi pour la liberté et la confiance que vous m'avez accordées, qui m'ont permis de m'épanouir, d'évoluer, d'acquérir de nouvelles compétences dans de nombreux domaines et de gagner en maturité. J'espère pouvoir compter sur vous en tant que mentor encore de nombreuses années.

Je tiens également à réserver un grand merci à Nelly, mon autre « grande cheffe », qui m'a pris sous son aile dès mon arrivée au laboratoire. Merci de m'avoir si bien formée, de m'avoir tout appris pour me permettre de mener à bien mon travail. Tu étais mon binôme de choc. Tu ne m'as pas lâchée, même une fois partie (ce dont j'ai peiné à me remettre), j'ai toujours pu compter sur toi et tu l'as encore démontré ces derniers jours. Au-delà du travail, j'ai trouvé une vraie amie, que je suis sûre de garder pour encore de nombreuses années.

Guillaume, ça va être rapide, tu n'es pas mon « labmate », je n'ai pas aimé travailler à côté de toi pendant 2ans, tu ne m'as pas faite rire une seule seconde, j'ai adoré quand on ne s'adressait pas la parole, j'ai adoré quand tu m'engueulais pour les quantifications de protéines, par contre j'ai détesté me « coltiner » tes blagues, j'ai détesté être dans le même bureau que toi, mais j'ai surtout détesté quand tu m'as abandonnée. Alors merci pour rien, ni pour notre complicité, ni pour ton aide, ni pour ton soutien à traverser la « zone de peur ». T'es pas un pote. Et la réponse à « Marie, est ce que.. », c'est oui. Bises.

Vu qu'on est dans la catégorie des acolytes de paillasse, mon brave Jérémy, je crois que j'ai rarement connu une personne avec autant de volonté et de bonté. Tu as su m'accueillir dans ton monde de la Biochimie et m'aider dans de nombreux projets. Ça a été un pur bonheur de pouvoir travailler avec toi, dans cette constante bonne humeur et j'espère que cela va pouvoir encore continuer les prochains mois ! Vous avez été adorables avec moi, toi et Christina, et je vous considère comme de véritables amis. Christina, ta bonne humeur contagieuse, et ta gentillesse sans faille ont été un bol d'air frais dans le quotidien parisien, alors un grand merci pour cela ! On aura bien rigolé tous les trois, déjà hâte du prochain burger chez Borat. « Nolude » à vous, et surtout Jérémy, n'oublie pas ... rab.

Aurélie, ma co-thésarde, merci pour ton soutien, et pour toute la confiance que tu places en moi, qui m'ont aidée à m'accrocher dans les moments difficiles. Merci pour ta bonne humeur, et ton positivisme, surtout ne change pas ça. Au fil du temps, nous avons pu nous comprendre, nous aider et j'espère pouvoir te rendre la pareille durant les prochains mois.

Parmi les personnes qui ont participé à mon travail, je ne pouvais pas oublier de remercier le petit (grand) Ivan, tu as été d'une aide précieuse à un moment qui était loin d'être idéal. Une fin de thèse, c'est mouvementé, mais tu as su t'adapter à merveille et nous permettre de produire des résultats de qualité. Cela a été un réel plaisir de pouvoir t'apprendre des choses et travailler avec toi, merci pour ta sympathie, et merci pour toutes ces découvertes gastronomiques que l'on pourra, je l'espère, faire perdurer.

Titine! Je te remercie pour toutes ces pauses de rigolade dans ces journées à cent à l'heure, mais aussi pour ton aide, et ta disponibilité. Échanger avec toi était un vrai plaisir, un moment de bonheur.

Je tiens aussi à remercier les autres membres du laboratoire, merci à Souhila pour tous les échanges scientifiques très intéressants, et pour ta présence. Merci à Aristeidis pour ton engouement dans nos futurs projets ; et à Angélique pour sans cesse proposer ton aide. Je remercie également les anciens membres de l'équipe Kevin et Roby, pour votre accueil, votre bonne humeur et pour m'avoir si bien intégrée dans l'équipe, et dans les projets du laboratoire.

Bien que la vie parisienne ne soit pas la vie idéale pour moi, j'ai eu la chance de trouver une « famille de substitution », daddy et mounie, Jeff et Laure. Nos fous rires sont incalculables, les souvenirs que j'ai avec vous sont parmi les plus beaux au sein de l'Unité et en dehors. Vous m'avez non seulement pris sous votre aile, mais vous m'avez aussi inclus comme si on se connaissait depuis toujours. Nous avons été là les uns pour les autres, dans les bons comme dans les mauvais moments, alors merci pour ces leçons de vie, merci pour toute cette force et merci pour la perspicacité scientifique que vous m'avez apportée.

Il serait trop long de faire la liste de toutes les personnes de l'Unité qui ont aidé à mon épanouissement personnel et professionnel. Merci à Lounis pour nos grandes discussions sur la vie, merci à Madeleine et Juliette pour leur sympathie et leur disponibilité pour aider les autres, merci aux mots gentils et blagues d'Olivier, Louis, Pia, Kevin, Léo, Manu, Alex, Kasturi, Kosuke, Sandra, Audrey, Baptiste et tous les autres !

J'ai eu la chance au cours de ma thèse de pouvoir donner des TP en « Génétique et Biologie Moléculaire » qui ont été une belle opportunité de transmettre mon savoir et ma passion et je tiens à remercier les responsables de ce module.

Merci à tous mes amis de « chez moi », dans le Sud : mes Kardash, Clément, Aurélie... et mes amis de Paris. Vous m'avez aidée à traverser mes doutes et mes remises en question. Merci pour votre patience, votre aide constante, et pour tout l'amour que vous m'avez apportés durant ces dernières années. Merci pour ces souvenirs incroyables, ces fous rires et pour m'avoir aidé à croire en moi : ma Clacki, mon alter ego, ma confidente ; mon Fanche, mon sbirounet ; mon Carlito, mon partenaire de Soujouk, merci pour votre amitié sans faille, merci d'être de si bons meilleurs amis. Merci à mon loco Yohan, mon adorable Camille, mon « meilleur Aleix », mon Titouan, mais aussi à Estelle, Greg et Emma, avec qui j'ai commencé la vie parisienne, pour leur soutien, leur amitié sans pareille et pour m'avoir fait rire et si bien changé les idées.

Bien évidemment, je n'aurais jamais pu accomplir ce travail sans l'aide de ma famille. Je remercie ma sœur, et mes neveux pour tous les bons moments partagés, ainsi que ma famille en Espagne pour leur éternel soutien. Je remercie ma tante pour tout son amour et pour ne voir que le meilleur en moi. Je tiens à remercier par-dessus tout, mes parents. Vous êtes ma force, vous êtes la raison qui me pousse à réussir, je ferai tout pour vous rendre fiers de moi. Vous m'avez accompagnée et soutenue dans chacun de mes choix, sans forcément tous les comprendre. Je n'aurais jamais pu accomplir tout ça sans vous, merci pour tous les sacrifices engendrés par mes études, merci de m'avoir laissée partir si jeune pour accomplir mon rêve de devenir chercheuse et merci d'avoir cru si fort en moi.

Théo, mon PIC, quelle idée de commencer une relation en même temps qu'une thèse ! Mais je ne le regrette pour rien au monde, tu as été mon échappatoire, ma bouffée d'oxygène, mon bonheur. Même à distance, tu as su partager avec moi chaque étape de ce voyage, bonne ou moins bonne, et ton amour m'a portée pour réussir. Alors, merci, et j'espère traverser encore de nombreuses épreuves mais surtout de merveilleux moments avec toi.

Enfin, je souhaite dédier ma thèse à ma grand-mère, qui nous a laissés en plein milieu de cette aventure. Merci pour la force que tu m'as transmise, pour les leçons de vie, et pour ton amour inconditionnel. Tu es avec moi chaque jour, mais j'aurais rêvé que tu puisses me voir devenir Docteur. Ce mémoire et la soutenance qui suivra, sont pour toi, ma Nanie.

Table des matières

- Remerciements	5
- Table des matières	9
- Table des figures/tableaux	15
- Abréviations	19
- Résumé en français	21
- Résumé an anglais	22
<u>Avant-propos</u>	23
<u>Introduction</u>	25
I- <u>Les interactions hôte-pathogène</u>	27
1) Généralités	27
2) Les infections par les Apicomplexes	28
a. Caractéristiques du phylum des Apicomplexes	28
(i) Phylogénie.....	28
(ii) Structures spécifiques aux Apicomplexes	29
(iii) Différents modes d'invasion.....	29
b. Habilité des Apicomplexes à tirer profit de leur hôte	30
(i) Plasmodium.....	30
(ii) Toxoplasma.....	31
(iii) Cryptosporidium.....	31
3) Le cas de Theileria Annulata	32
a. Généralités et problématiques sanitaires	32
b. Le cycle de vie parasitaire	33
c. Particularités de Theileria comparées aux autres Apicomplexes	34
(i) La transformation de la cellule hôte	34
(ii) La réponse immunitaire face à l'infection	34
(iii) Impact de l'infection sur l'expression génique et les voies de signalisation de l'hôte (c-Jun/JNK ; p53 ; NFκB ; c-Myc ; OncomiR155 ; HIF-1α)	35

4) Les phénomènes de sécrétion et séquestration au sein de l'interaction hôte-pathogène	37
a. La sécrétion de protéines parasitaires	37
(i) Les protéine Tash	37
(ii) La protéine TaPin1	38
(iii) Une protéine inconnue impactant la tumorigénèse	38
b. La séquestration des protéines de l'hôte	39
(i) Clasp1 et ses interacteurs	39
(ii) L'ultrastructure de la surface parasitaire permettant cette séquestration ..	40
5) Diagnostics et traitements de <i>Theileria annulata</i>	41
(i) Les signes cliniques	41
(ii) Le dépistage	42
(iii) Les traitements	42
II- <u>Rôle de l'épigénétique lors de l'infection</u>	43
1) La machinerie épigénétique	43
a. Histoire et définition de l'épigénétique	43
b. L'état chromatinien dépend des modifications sur les histones et l'ADN	44
c. La méthylation des lysines : un des acteurs de modifications post-traductionnelles	45
2) L'impact de l'épigénétique au cours de l'infection	48
Préambule	48
a. Détournement de la machinerie épigénétique et manipulation de l'expression des gènes de l'hôte par le parasite (cf revue Annexe 1)	49
b. Le rôle majeur de la machinerie épigénétique parasitaire pour l'infection	50
(i) Le cas de <i>Plasmodium</i>	50
(ii) Le cas de <i>Toxoplasma</i>	50
(iii) Le cas de <i>Theileria annulata</i>	51

3) L'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes épigénétiques	52
a. <i>L'inversion des modifications épigénétiques : une stratégie thérapeutique intéressante</i>	52
b. <i>Inhibiteurs d'enzymes épigénétique au sein de l'infection : focus sur LSD1</i> ...	53
III- <u>L'autophagie : un processus complexe mais omniprésent</u>	56
1) Généralités sur l'autophagie	56
a. <i>Historique de l'autophagie</i>	56
b. <i>Les mécanismes autophagiques et les différents types d'autophagie</i>	56
c. <i>Les pathologies associées à l'autophagie</i>	57
d. <i>Les voies autophagiques et la formation de l'autophagosome</i>	58
(i) <i>Deux voies principales pour activer (AMPK) et inhiber (mTOR) l'autophagie.</i>	58
(ii) <i>La phase d'initiation : formation du phagophore</i>	58
(iii) <i>La phase d'élongation : formation de l'autophagosome</i>	59
(iv) <i>La phase de maturation de la formation de l'autophagosome</i>	59
2) Rôle central de l'autophagie dans l'infection parasitaire	60
a) <i>La dualité de l'autophagie au cours de l'infection</i>	60
b) <i>Les processus autophagiques au sein des Apicomplexes</i>	61
(i) <i>L'autophagie parasitaire</i>	61
(ii) <i>L'autophagie de l'hôte pour éliminer le parasite</i>	62
(iii) <i>L'autophagie chez T. annulata</i>	63
<u>Objectifs et publications</u>	65
<u>Matériel et méthodes</u>	69
- <i>Traitements des cellules infectées par T. annulata</i>	70
- <i>Extraction des protéines et western blot</i>	70
- <i>Immunofluorescence et microscopie</i>	70
- <i>Néon-transfection</i>	71
- <i>« Click chemistry »</i>	71

Résultats73

I- Identification et caractérisation d'une nouvelle marque épigénétique importante pour le cycle de vie parasitaire chez *T. annulata* : H3K18me1

- 1) **Introduction**75
- 2) **Article** “*Dynamic methylation of Histone H3K18 in differentiating Theileria parasites*”77
- 3) **Discussion additionnelle** 114
- a. *La méthylation de H3K18me régule la différenciation parasitaire*114
 - b. *TaSETup1 est la première enzyme épigénétique décrite chez *T. annulata** ...115
 - c. *Régulation chromatiniennne chez les Apicomplexes*116
 - d. *Une approche de « génétique chimique » pour étudier *Theileria**117

II- Découverte d'un nouvel anti-theilerial grâce à un criblage microscopique de la « Medicines for Malaria Venture (MMV) Pathogen Box » 119

Criblage 1

- 1) **Introduction** 119
- a. *Développement d'un criblage cellulaire*.....119
 - b. *Librairie de molécules connues dans d'autres infections*120
- 2) **Article** “*Trifloxystrobin blocks the growth and differentiation of Theileria parasites independently of the TaPin1 effector*”121
- 3) **Discussion additionnelle**.....143
- a. *MMV : une librairie en libre accès pour la découverte de nouvelles molécules* ..143
 - b. *Le mode d'action de MMV668754 : un composé prometteur*143
 - c. *Perspectives pour déterminer la cible de MMV668754*145

III- Caractérisation d'un nouvel antiparasitaire prometteur : MC2646 ...147

Criblage 2

- 1) **Criblage d'inhibiteurs d'enzymes épigénétiques**147
- a. *Un criblage centré sur l'épigénétique de l'interaction hôte-pathogène*147
 - b. *Sélection et identification des meilleurs « hits »*148

2) Validation des 2 composés prometteurs : MC2645 & MC2646	151
a. Validation de la cytotoxicité parasitaire	151
b. L'effet de MC2645 et MC2646 est indépendant du type cellulaire	152
c. MC2645 et MC2646 n'impactent pas la survie et le cycle cellulaire de l'hôte	152
d. Les deux composés inhibent le passage en mérogonie	155
e. MC2645 et MC2646 impactent le caractère transformant de l'hôte	156
Conclusion : Sélection de MC2646 comme un candidat prometteur	156
3) Le phénotype de MC2646 n'est pas associé à l'histone déméthylase LSD1	157
4) Recherche de la cible de MC2646 : nouveau composé anti theilerial	159
a. Description de la technique innovante de « Click chemistry »	159
b. Utilisation de la « Click chemistry » pour localiser le composé dans les cellules.	160
c. Vérification de la spécificité du composé Click MC4404	162
d. Caractérisation de la cible de MC2646 par Spectrométrie de Masse	163
e. Candidats prioritairement étudiés	166
5) eIF5a : une potentielle cible de MC2646, actrice de l'autophagie	167
a. Détermination du rôle de eIF5a et son hypusination	167
b. L'inhibition de l'hypusination au sein des cellules infectées par <i>T. annulata</i>	167
c. Séquestration de eIF5a à côté des noyaux parasitaires	169
IV- <u>Rôle central de l'autophagie dans l'infection : une potentielle cible thérapeutique de MC2646</u>	171
1) Caractérisation du mode d'action de MC2646	171
a. Mise en relation du composé MC2646 avec l'autophagie	171
b. Analyse transcriptomique après traitement MC2646	171
c. L'utilisation de la chimie génétique étudier l'effet de MC2646 sur l'autophagie	174
d. Caractérisation de la voie AMPK dans les cellules infectées par <i>T. annulata</i>	175
e. Détermination de la translocation nucléaire du facteur TFEB	176
2) Étude des marqueurs clés de l'autophagie dans les cellules infectées par <i>T. annulata</i>	177
a. Caractérisation du statut lysosomal dans les cellules B bovines infectées et non infectées	178
b. Localisation des composants de l'autophagosome : LC3-II et p62, dans les cellules infectées	179

3)	Caractérisation du statut autophagie au sein des cellules infectées	182
a.	<i>Comparaison de l'ultrastructure des cellules infectées et non infectées</i>	182
b.	<i>Le profil de LC3-II dans les cellules infectées et non infectées</i>	183
4)	Le composé MC2646 : un inducteur d'autophagie dans les cellules infectées par <i>T. annulata</i>	184
a.	<i>L'impact du composé MC2646 sur l'ultrastructure des cellules infectées</i>	184
b.	<i>Caractérisation de l'effet de MC2646 sur le flux autophagique au sein des cellules infectées</i>	185
c.	<i>Détermination de l'effet de MC2646 sur la fusion autophagosomes-lysosomes.</i>	189
	<u>Résumé des résultats</u>	191
	<u>Discussion</u>	193
1)	Approfondir les données fournies par les criblages	196
2)	Caractériser le comportement du schizonte après traitement MC2646 : division parasitaire asymétrique	197
3)	La remise en question du dogme de co-dépendance hôte parasite	199
4)	La diminution du phénotype transformant entraînée par MC2646	199
5)	Le rôle de LSD1 et de la méthylation pour réduire l'infection	200
6)	L'effet des traitements sur l'expression génique hôte et parasitaire	202
7)	La détermination de la cible du composé candidat MC2646	203
8)	L'activation de l'autophagie au sein des cellules infectées via MC2646	205
a.	<i>La caractérisation du flux autophagique</i>	206
b.	<i>L'étude des profils de LC3B</i>	207
c.	<i>L'utilisation d'inhibiteurs et activateurs de l'autophagie</i>	209
d.	<i>L'activation de la voie AMPK</i>	210
9)	Les différents profils de séquestration parasitaire	211
10)	L'utilisation de nouvelles molécules ciblant l'épigénétique : les traitements de l'avenir	214
	<u>Annexes</u>	217
	<u>Annexe 1 : Revue</u> "The clever strategies used by intracellular parasites to hijack host gene expression" dans « <i>Seminars in Immunopathology</i> »	219
	<u>Annexe 2 : Tableau des 146 candidats potentiels de MC2646 obtenus après une expérience de spectrométrie de masse</u>	230
	<u>Annexe 3 : Theileria, un habile « séquestreur »</u>	233
	Différents profils de séquestration	
(i)	<i>Séquestration au niveau du syncycium parasitaire</i>	233
(ii)	<i>Séquestration à côté ou entre les noyaux parasitaires (AL)</i>	236

Table des figures/tableaux

<u>Figure 1</u> : Arbre phylogénique des Apicomplexes	28
<u>Figure 2</u> : Modes d'invasion des Apicomplexes	30
<u>Figure 3</u> : Cycle de vie de <i>Plasmodium</i> , <i>Toxoplasma</i> et <i>Cryptosporidium</i>	32
<u>Figure 4</u> : Cycle de vie de <i>Theileria annulata</i>	33
<u>Figure 5</u> : Différentes stratégies de <i>T. annulata</i> pour détourner les machineries hôtes.	39
<u>Figure 6</u> : Interactions hôte-parasite sur la surface du schizonte de <i>T. annulata</i>	41
<u>Figure 7</u> : Niveaux de compaction de l'ADN	44
<u>Figure 8</u> : Conformation d'un nucléosome	45
<u>Figure 9</u> : Panel de modifications post-traductionnelles	46
<u>Figure 10</u> : Régulation des états chromatinien	47
<u>Figure 11</u> : Cibler l'interaction hôte-parasite pour découvrir de nouveaux traitements.	53
<u>Figure 12</u> : Le rôle central de LSD1 dans de nombreux cancers	55
<u>Figure 13</u> : Schéma simplifié des processus autophagiques	60
<u>Figure 14</u> : Inhibition de la voie AMPK chez <i>Plasmodium</i>	63
<u>Figure 15</u> : Types cellulaires utilisés au laboratoire	66
<u>Figure 16</u> : Concept de la Chimie génétique	66
<u>Figure 17</u> : Schéma récapitulatif du projet de thèse	67
<u>Figure 18</u> : Schéma de la réaction de « click chemistry »	72
<u>Figure 19</u> : La structure cristallographique de TaSETUP1	115
<u>Figure 20</u> : Panel de maladies ciblées par la Pathogen Box	120
<u>Figure 21</u> : Liste de potentielles protéines sécrétées de <i>T.annulata</i>	145
<u>Figure 22</u> : Criblage microscopique d'inhibiteurs d'enzymes épigénétiques	149
<u>Figure 23</u> : Structures du composé TCP et ses dérivés	150
<u>Figure 24</u> : Résultats du criblage sur la survie parasitaire de MC2645-MC2646	150
<u>Figure 25</u> : Gamme de concentration de MC2645 et MC2646	151
<u>Figure 26</u> : Effets de MC2645 et MC2646 sur la survie parasitaire	153
<u>Figure 27</u> : Effets de MC2645-MC2646 sur la survie et le cycle cellulaire de l'hôte	154
<u>Figure 28</u> : Effets de MC2645-MC2646 sur le cycle de vie parasitaire	155
<u>Figure 29</u> : Effets de MC2645-MC2646 sur la transformation cellulaire	156
<u>Figure 30</u> : Impact sur la survie parasitaire d'une délétion de LSD1	158
<u>Figure 31</u> : Caractéristiques principales des réactions utilisant la « chimie click »	159

<u>Figure 32</u> : Cible du composé MC2646 dans différents types cellulaires	161
<u>Figure 33</u> : Effet du traitement MC2646 sur sa cible	162
<u>Figure 34</u> : Compétition entre le composé parent et le composé « click »	163
<u>Figure 35</u> : Pull down du composé pour déterminer sa cible	164
<u>Figure 36</u> : Validation du candidat Complément C3	166
<u>Figure 37</u> : Réaction d'hypusination	167
<u>Figure 38</u> : L'hypusination de eIF5A dans les cellules infectées	168
<u>Figure 39</u> : Profil de séquestration de eIF5A dans les cellules infectées	170
<u>Figure 40</u> : Gene Ontology des gènes surexprimés après le traitement MC2646 dans les cellules infectées TBL3	172
<u>Figure 41</u> : Test sur la survie parasitaire des activateurs ou inhibiteurs d'autophagie connus	174
<u>Figure 42</u> : Statut de la voie AMPK dans les cellules infectées TBL3	175
<u>Figure 43</u> : Profils de TFEB dans les cellules infectées suite à divers traitements	177
<u>Figure 44</u> : Profil lysosomal dans les cellules infectées ou non infectées par <i>T.annulata</i>	178
<u>Figure 45</u> : Profils des marqueurs de l'autophagosome dans les cellules infectées et non infectées par <i>T. annulata</i>	180
<u>Figure 46</u> : Action du composé MC2646 sur LC3B exogène	181
<u>Figure 47</u> : Différences dans l'ultrastructure de cellules infectées et non infectées par <i>T.</i> <i>annulata</i>	183
<u>Figure 48</u> : Profils de LC3B dans les cellules infectées et non infectées, avec ou sans traitement MC2646	184
<u>Figure 49</u> : Ultrastructure de cellules infectées et traitées par le composé MC2646	185
<u>Figure 50</u> : Profil de LC3B dans les cellules infectées puis traitées MC2646	186
<u>Figure 51</u> : Statut du flux autophagique dans les cellules infectées puis traitées MC2646 ...	188
<u>Figure 52</u> : Validation au niveau protéique des observations in vivo sur le flux autophagique au sein des cellules infectées et traitées avec MC2646	189
<u>Figure 53</u> : Fusion entre autophagosome et lysosome après traitement MC2646	190
<u>Figure 54</u> : Division parasitaire asymétrique après traitement MC2646	197
<u>Figure 55</u> : Premières étapes de maturation du parasite <i>Plasmodium falciparum</i> au sein des cellules sanguines	203
<u>Figure 56</u> : Effet d'un long traitement Chloroquine sur le profil de LC3B et « click », cible de MC2646	208
<u>Figure 57</u> : LC3B englobe les parasites après traitement MC2646	208

<u>Figure 58</u> : Modèle d'induction de l'autophagie via la translocation nucléaire de p53 et TFEB	211
<u>Figure 59</u> : Modèle proposé pour le rôle du traitement MC2646	213
<u>Figure 60</u> : Les différents profils de séquestration des protéines hôtes par le parasite	214
<u>Figure 61</u> : Profils de protéines hôtes séquestrées au parasite comparés au profil du « click » de MC2646	235
<u>Figure 62</u> : Profils des protéines eIF5A, ATG16L1 et la cible de MC2646 séquestrées au parasite différent du marquage des AL	238
<u>Table 1</u> : Composition de la librairie d'inhibiteurs d'enzymes enzymatiques	147
<u>Table 2</u> : Sélection de protéines cibles candidates du composé MC2646 suite à l'expérience de Spectrométrie de Masse	165
<u>Table 3</u> : Liste de gènes candidats différentiellement exprimés entre infection et traitement MC2646	173
<u>Table 4</u> : Tableau récapitulatif des divers composés utilisés et caractérisés au cours de cette étude	195

Abréviations

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- AMPK: AMP-activated protein kinase
- APAF-1: Apoptotic peptidase activating Factor1
- ARN : Acide ribonucléique
- ATG16L1: Autophagy related 16 like 1
- BafA1: BafilomycineA1
- BAX: Bcl2 associated X protein
- Bcl-2: Bcell CLL/Lymphoma 2
- BioID: Proximity-dependent biotinylation identification
- BRDU: Bromodésoxyuridine
- Bup : Buparvaquone
- CD2AP : CD2-associated protein
- CQ: Chloroquine
- CIN85: Cbl-interacting 85-kDa protein
- CLASP1: Cytoplasmic linker associated protein 1
- Click / clickable : réaction de Click chemistry ou composé pouvant subir cette réaction
- DNMT: ADN méthyltransférase
- DTM : Dipentaméthylène thiuram monosulfide
- EZH2: Enhancer of zeste homolog 2
- eIF5A : Eukaryotic translation initiation factor 5A-1
- GST: Glutathion-S-Transferase
- HAT: Histone acetyltransferases
- HDM : Histone déméthylase
- HDAC : Histone Déacétylase
- HKMT: Histone méthyltransférase
- HK2 : Hexokinase 2
- IF : Immunofluorescence
- IP : Immunoprécipitation
- KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
- LSD1 : Lysine-specific histone demethylase 1A
- miR155 : Micro ARN 155
- MMP9: Métalloprotéase matricielle 9
- mTORC1: Mechanistic target of rapamycin complexe 1
- PINK1: PTEN-induced kinase 1
- PKM2 : Pyruvate kinase musculaire 2
- PD-MS : Pull-down et Spectrométrie de masse
- Rap: Rapamycine
- SAM : S-Adénosylméthionine
- SET : Suvar3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax
- SIRT: Sirtuine
- TaMISHIP: *Theileria* SH3 domain-interacting protein
- TaPin1: *Theileria* Peptidyl-Prolyl *Cis/Trans* Isomerase
- TaSP: *Theileria annulata* Surface Protein
- TCP : Tranlycypromine
- UIS3 : Up-regulated in infective sporozoites gene 3

Résumé en français

Un cinquième des cancers sont d'origine infectieuse, soulignant l'importance de trouver de nouveaux traitements contre les infections microbiennes. Nous étudions un modèle expérimental unique de transformation leucocytaire, induite par *Theileria annulata*, à la croisée des chemins entre les domaines des maladies infectieuses, du cancer et de l'épigénétique. *Theileria* est une famille de parasites intracellulaires appartenant au phylum des Apicomplexes ; ils sont liés à des agents pathogènes plus connus qui causent de graves maladies humaines (comme le Paludisme dû à Plasmodium ou Toxoplasma responsable de la Toxoplasmose). *Theileria* est un vrai maître dans la manipulation du réseau de signalisation de la cellule hôte et de l'épigénome de l'hôte bovin. Il a la remarquable capacité de transformer les leucocytes de l'hôte, provoquant des tumeurs de type lymphome chez les bovins et la mort du bétail avec de graves conséquences socio-économiques dans les pays d'Afrique et d'Asie.

Nous avons mis en place des criblages basés sur la microscopie pour rechercher de nouveaux traitements contre la theilériose et des inhibiteurs du phénotype transformé par le parasite dans les cellules infectées. Nous avons testé un grand nombre de composés, notamment (i) une bibliothèque d'inhibiteurs anti-infectieux connus, pour rechercher des alternatives à la molécule anti-Theileriale, la Buparvaquone et (ii) une bibliothèque de composés développés comme inhibiteurs d'enzymes épigénétiques pour traiter le cancer. Le premier criblage a permis d'identifier une nouvelle molécule dont le mécanisme d'action n'implique pas l'oncoprotéine parasitaire sécrétée TaPin1. Nous avons découvert dans le second criblage de nouveaux composés ayant la capacité inattendue de réduire la survie des parasites sans impacter la prolifération des cellules hôtes. Nous avons développé des approches de « Click chemistry » et de protéomiques pour déterminer la cible de ces composés et caractériser leur mode d'action. Cela nous a permis de constater que la régulation de l'autophagie était primordiale dans le processus d'infection : elle serait inhibée par *T.annulata* et réactivée suite au traitement.

Au cours de ces études, nous avons également identifié une nouvelle marque d'histone spécifique du parasite (monométhylation H3K18), qui joue un rôle central dans le cycle de vie de *T.annulata* et représente également une cible pour un potentiel traitement.

Ces résultats combinés mettent en évidence différentes stratégies pour cibler soit les protéines parasitaires, soit les voies cellulaires de l'hôte afin de lutter contre l'infection parasitaire. Nous concluons que *T.annulata* offre un modèle fascinant pour explorer la complexité des interactions hôte-parasite dans le but de développer de nouvelles thérapies anti-parasitaires et même anti-cancéreuses.

Mots clés : Interactions parasite-hôte - épigénétique - cancer - petites molécules inhibitrices – autophagie

Résumé en anglais

Around 20% of cancers have an infectious origin, highlighting the importance of new treatments against microbial infections. We study the unique experimental model of *Theileria*-induced leukocyte transformation, at the cross-roads between the fields of infectious diseases, cancer and epigenetics. *Theileria* spp. are a family of intracellular parasites belonging to the Apicomplexa phylum; they are related to well-known pathogens that cause human diseases (such as *Plasmodium* that causes malaria or *Toxoplasma* that causes toxoplasmosis). *Theileria* parasites are masters of manipulating the host cell signaling network and bovine host epigenome. *Theileria annulata* has the remarkable ability to transform host leukocytes, causing lymphoma-like tumors in cattle and livestock fatality with serious socio-economic consequences in countries across Africa and Asia.

We set up microscopy-based screens to search for new treatments against theileriosis and inhibitors of the parasite-transformed phenotypes in infected cells. We tested a large number of compounds, including (i) a library of known anti-infection inhibitors to search for alternatives to the anti-*Theileria* drug Buparvaquone, and (ii) a library of compounds developed as inhibitors of epigenetic enzymes to treat cancer. The former identified a novel drug which functions without targeting the secreted parasite oncoprotein TaPin1. The latter led us to novel compounds with the unexpected capacity to reduce parasite survival without impacting host cell proliferation. We developed "Click chemistry" and proteomics approaches to determine the target of these drugs and characterize their mode of action. We found that regulation of host cell autophagy appears to be critical for parasite survival and drug action. During these studies, we also identified a novel parasite-specific histone mark (H3K18 methylation), that plays a central role in the life cycle of *T.annulata* and also represents a target for drug intervention.

These combined findings highlight different strategies to target either parasite proteins or host cellular pathways in order to fight parasite infection. We conclude that *T.annulata* offers a fascinating model to explore the complexity of parasite-host interactions in an attempt to develop novel therapeutics.

Keywords: Parasite-host interactions - epigenetics - cancer - small inhibitory molecules - autophagy

Avant-propos

Au cours de la dernière décennie, le nombre de personnes atteintes de cancer semble augmenter. Cette maladie entraîne une multiplication incontrôlée des cellules d'un tissu ou organe, qui acquièrent également des capacités invasives et métastatiques, menaçant la survie de l'organisme tout entier. Le cancer n'est pas seulement une maladie génétique ; des causes environnementales, associées à des modifications épigénétiques, peuvent aussi être responsables de cette pathologie. Les mutations génétiques sur des oncogènes peuvent prédisposer au développement de certains cancers.¹ L'altération des mécanismes épigénétiques joue un rôle dans la tumorigénèse via les ARN non codants, les modifications post traductionnelles des histones, la méthylation de l'ADN... ils vont impacter l'expression des gènes sans modifier la séquence ADN.

Le cancer est la première cause de mortalité mondiale, et environ 20% des cancers ont une origine infectieuse.² *Theileria* est un organisme modèle innovant permettant d'étudier à la fois la parasitologie et la cancérologie. De nombreuses protéines hôtes et parasitaires sont respectivement séquestrées ou sécrétées : il y a un grand nombre d'échanges dans cette interaction hôte-pathogène, amenant à des modifications de l'expression génique chez l'hôte. Durant cette étude, nous avons pu comparer les cellules non infectées et infectées par *Theileria annulata*, afin de déterminer plus clairement les voies moléculaires impactées, ainsi que leur importance dans l'infection et la cancérogénèse.³⁻⁷

Les recherches de traitements anti-pathogènes, via la vaccination ou la découverte de nouvelles molécules effectrices, sont une priorité. Une nouvelle approche visant à cibler l'interaction établie entre les deux organismes, plutôt que le parasite lui-même, permettrait d'éliminer ce dernier sans trop impacter la cellule hôte.

Nous avons donc fait le choix d'étudier l'interaction hôte-pathogène chez *T. annulata*, en utilisant des petites molécules ciblant les acteurs épigénétiques de l'hôte, du parasite ou des deux. Ces molécules auront la capacité d'agir sur de nombreux mécanismes comme la tumorigénèse, l'échappement du parasite au système immunitaire et à l'autophagie, les protéines séquestrées ou sécrétées par le parasite, le cycle parasitaire, et pourront impacter la survie de l'hôte ou du parasite.

Introduction

I- Les interactions hôte-pathogène

I- 1) Généralités

Les interactions hôte-pathogène sont définies comme la manière dont les bactéries, parasites ou virus se comportent pour survivre, se diviser, se répandre, dans un organisme hôte mais également qu'elle va être la réponse de l'hôte face à cette intrusion. Ces interactions peuvent avoir lieu au niveau d'une population, d'un organisme, mais également au niveau moléculaire et cellulaire. Les interactions hôte-pathogène sont classées en différents types :

- le mutualisme, où les deux organismes tirent profit de la situation ; l'exemple le plus connu est celui du microbiote intestinal ou flore intestinale, composé principalement de bactéries qui protègent l'hôte d'autres agents pathogènes, jouent un rôle nutritionnel important et aident le système immunitaire.⁸

- le commensalisme, où seulement un des deux organismes tire un avantage de l'interaction, sans pour autant nuire ou aider le second.⁹

- le parasitisme, un seul organisme tire profit de cette symbiose au détriment de l'autre, et vit souvent à ses dépens.

Dans ce dernier cas, les stratégies développées par les agents pathogènes sont nombreuses, très sophistiquées, elles ont majoritairement pour but de détourner les machineries cellulaires de l'hôte afin d'inhiber les réponses de défense.

D'après les données de l'Institut Pasteur, les maladies infectieuses sont responsables d'environ 17 millions de décès par an dans le monde, soit un tiers de la mortalité mondiale. Les pays en voie de développement sont les plus touchés car les décès causés par les maladies infectieuses accroissent la pauvreté et les inégalités avec les pays riches, tout en réduisant leur croissance économique.¹⁰ Jusqu'à l'apparition des multi-résistances, les antibiotiques étaient le traitement pour vaincre les infections bactériennes ; il existe également des antiparasitaires et antiviraux pour les autres types d'agents pathogènes.

La malaria, aussi appelée paludisme, est l'exemple parfait de parasitisme, ce parasite est responsable de 405000 décès dans le monde. La recherche de vaccin anti-malarial progresse depuis les années 1980, mais il aura fallu attendre le mois d'Octobre 2021 pour que l'OMS recommande l'utilisation généralisée du vaccin antipaludique dans les zones concernées. Cet agent pathogène fait partie de la famille des Apicomplexes qui est au centre de notre étude.

I- 2) Les infections par les Apicomplexes :

I- 2) a. Caractéristiques du phylum des Apicomplexes :

(i) Phylogénie :

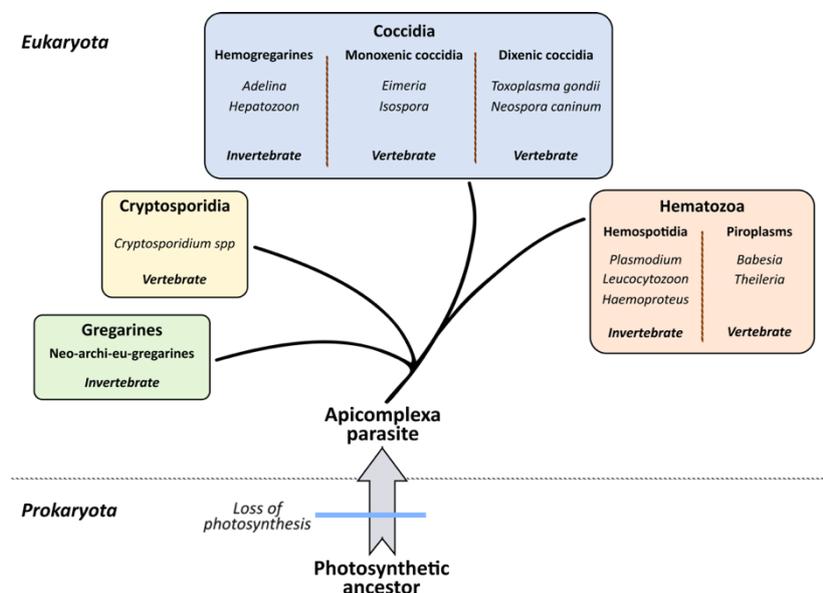
Les parasites du phylum Apicomplexa sont devenus maîtres pour manipuler leur hôte et représentent une grande partie de la mortalité par infection dans le monde. Les apicomplexes sont des parasites eucaryotes, unicellulaires et intracellulaires qui comprennent plusieurs agents pathogènes virulents avec des processus biologiques variés et une capacité unique à modifier les processus cellulaires chez leurs hôtes. Ces agents pathogènes ont suscité beaucoup d'intérêt en raison de leur impact dévastateur sur la santé humaine et animale.

De plus, des études récentes ont révélé de nombreuses informations sur leurs mécanismes uniques d'entrée dans la cellule hôte, leurs cycles de vie, et leur capacité à manipuler les voies de signalisation et la régulation des gènes au sein des cellules infectées.¹¹

Ce phylum très complexe contient environ 4000 espèces pouvant être responsables de pathologies humaines ou animales. Ces organismes unicellulaires infectent une large gamme d'hôtes comprenant des Invertébrés (insectes, mollusques) et des Vertébrés (animaux de ferme, humains)¹² (cf Fig.1). Il se décrit en 4 grands groupes les Grégarines, les Cryptosporidia, les Coccidia, et les Hematozoa, ayant tous un ancêtre commun procaryote qui était capable de réaliser le phénomène de photosynthèse.

La cellule hôte qu'ils infectent est leur source en nutriments permettant leur division et dissémination et aidant également à échapper au système immunitaire.

Fig. 1 : Arbre phylogénique schématique de la famille des Apicomplexes : Organismes eucaryotes unicellulaires ; capacité à infecter des hôtes vertébrés ou invertébrés. Villares et al., 2019



(ii) Structures spécifiques aux Apicomplexes :

Les parasites apicomplexes ont souvent plusieurs hôtes au cours de leur cycle de vie et sont caractérisés par des structures particulières :

- ils ont une région apicale essentielle à l'invasion, composée de molécules sécrétoires (rhoptries et micronèmes) et organisant le cytosquelette ;
- ils possèdent également un apicoplast (plaste non photosynthétique résultant d'une endosymbiose avec une algue)¹³, synthétisant des métabolites comme les lipides et donc essentiels à la survie parasitaire. Cependant, les Apicomplexes sont dans l'incapacité de synthétiser de novo des purines, ils sont donc entièrement dépendants de leur hôte et sont devenus maîtres dans la manipulation de ce dernier.¹⁴

(iii) Différents modes d'invasion :

Les parasites Apicomplexes comme *Plasmodium* ou *Toxoplasma* utilisent un processus actif et très rapide (30 secondes) pour entrer dans leur cellule hôte. Ils résident au sein d'une vacuole parasitophore (VP) formée à partir de la membrane plasmique de l'hôte.¹⁵ La VP est invaginée en formant une structure appelée « moving junction », puis le parasite va se retrouver dans le cytoplasme de la cellule hôte.¹⁶ Les parasites ont développé un système de sécrétion des protéines contenues au niveau de leur pôle apical dans des granules denses (GRA), et des rhoptries (ROP) pour aider l'entrée du parasite dans la cellule hôte.^{17,18} Le VP confine les parasites intracellulaires, empêchant l'interaction directe avec les protéines cytosoliques de l'hôte.

Le genre *Cryptosporidium*, entraîne également un remodelage important des filaments d'actine de l'hôte permettant une fusion entre les microvillosités des entérocytes et de la vacuole parasitaire.¹⁹

Contrairement aux autres membres de sa famille, *Theileria* entre dans la cellule par un mécanisme passif. La protéine p67 parasitaire reconnaît et permet la fixation du parasite à la cellule hôte, ce qui est probablement dû à une reconnaissance du Complexe Majeur Histocompatibilité (CMH ; sa délétion empêchant l'infection). Le parasite est donc naturellement internalisé, entraînant le décrochement la protéine p67. *Theileria* n'est pas entouré de VP, il dégrade sa vacuole parasitaire et reste dans le cytoplasme de l'hôte sans « protection », dans une structure de schizonte multicellulaire attachée aux microtubules de la cellule bovine.^{20,21}

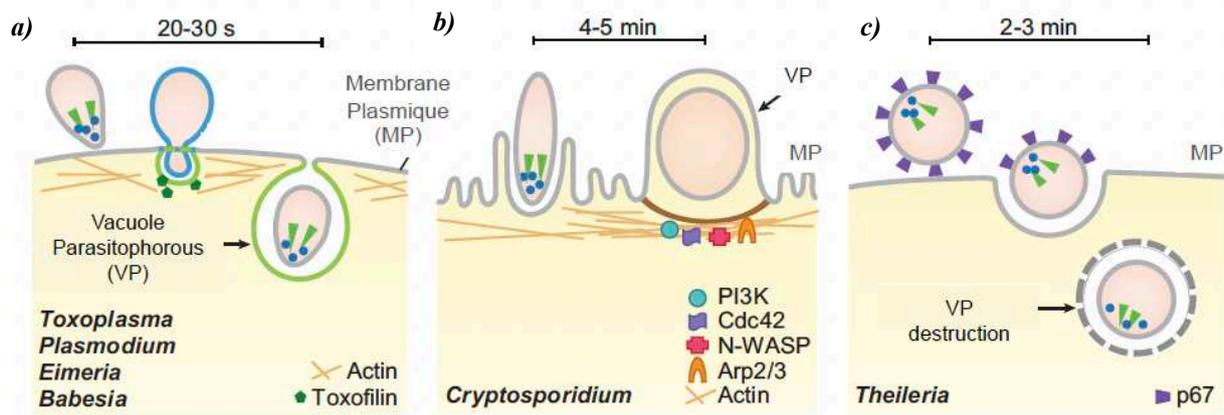


Fig. 2 : Entrée des apicomplexes dans la cellule hôte et formation de la vacuole parasitophore (VP). Les rhoptries sont représentés en vert ; les micronèmes sont représentés en bleu.

(a) *Toxoplasma* et *Plasmodium* : entrée active menant à la formation d'une VP. Les protéines du micronème et du rhoptry déchargent leur contenu à l'extrémité apicale et participent à la formation de la jonction mobile.

(b) *Cryptosporidium* : entrée active conduisant à la formation d'une vacuole intracellulaire mais extracytoplasmique. Les protéines des micronèmes et des rhoptry sont sécrétées pendant l'invasion, et le cytosquelette d'actine de la cellule hôte est remodelé sous et autour de la cellule.

(c) *Theileria* : absorption passive. Le contact initial avec un récepteur de la surface du lymphocyte suivi par un mécanisme de fermeture éclair conduit à l'internalisation du parasite.

Figure adaptée de l'article "Hijacking of Host Cellular Functions by the Apicomplexa" - Fabienne Plattner & Dominique Soldati-Favre

I- 2) b. *Habilité des Apicomplexes à tirer profit de leur hôte*

Chez les Apicomplexes, deux stades évolutifs du cycle de vie parasitaire se suivent : la forme schizogonique multinuclée et la forme mérogonie qui est leur processus de reproduction asexuée. Le parasite se réplique à plusieurs reprises jusqu'à entraîner sa libération dans la circulation sanguine et la mort de la cellule hôte.

(i) *Plasmodium* :

Les Apicomplexes les plus connus sont responsables de graves maladies humaines, c'est le cas de *Plasmodium falciparum*, responsable du paludisme, causant la mort de plus de 400000 personnes par an. *P. falciparum* a comme vecteurs les moustiques, plus précisément, il est transmis à l'Homme par une Anophèle femelle qui en est l'hôte définitif. *P. falciparum* va infecter majoritairement les hépatocytes et les érythrocytes.²² Il va proliférer dans les cellules hépatiques sous forme schizonte, puis se différencier en mérozoïtes. Il infecte ensuite les globules rouges, et il va exprimer à leurs surfaces des molécules variantes pour échapper au système immunitaire.

Le génie du parasite *Plasmodium* repose sur les variations antigéniques de ses molécules de surface PfEMP1, codées par environ 60 gènes *var* qui vont s'exprimer individuellement à un temps donné. Cette stratégie de « cheval de Troie » permet aux érythrocytes parasités d'échapper au système immunitaire.²³⁻²⁶ Contrairement à *P. falciparum* dont la transmission est vectorielle (via les moustiques), d'autres parasites Apicomplexes peuvent être transmis aux hôtes mammifères directement par la contamination de la nourriture, de l'eau...

(ii) *Toxoplasma* :

T.gondii provoque, chez l'Homme, la Toxoplasmose suite à une transmission notamment par les chats qui en sont l'hôte définitif.²⁷ Cette maladie peut être asymptomatique et bénigne chez les sujets en bonne santé mais peut être fatale chez les personnes immunodéprimées ou les femmes enceintes. Chez l'Homme qui est son hôte intermédiaire, *T.gondii* se développe dans des vacuoles, sous la forme tachyzoïte. Cette forme proliférative a une grande capacité d'infection de nombreux types cellulaires : les cellules immunitaires, nerveuses, musculaires, rétiniennes... que *T.gondii* lysera après plusieurs cycles de réplication. Sous cette forme, le parasite peut être éliminé par le système immunitaire mais il est également capable de prendre une forme de vie latente appelée bradyzoïte, qui persiste à vie dans certaines cellules.²⁸

(iii) *Cryptosporidium* :

D'autres parasites coccidiens, comme *Cryptosporidium*, affectent humains et animaux suite à l'ingestion d'oocystes (aliments ou eau contaminés de matières fécales). La Cryptosporidiose est une maladie diarrhéique chronique qui touche environ 10 millions de personnes par an. Elle peut être asymptomatique mais aussi potentiellement mortelle chez les patients immunodéprimés. Cet agent pathogène est lié à une diarrhée aiguë et il est très fréquent chez l'enfant d'environ 1 an : l'infection augmente le niveau de mortalité ou provoque un déficit de croissance corporelle et de développement cognitif. Après l'entrée du parasite dans l'intestin, ce dernier forme une sorte de vacuole au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales intestinales. *Cryptosporidium* échange beaucoup de molécules effectrices avec son hôte qui contribuent à l'infection et au développement du parasite dans la cellule hôte, altérant le profil d'expression des gènes de cette dernière. Malheureusement, il n'existe pas de véritable traitement pour cette maladie. De plus, des études récentes montrent une corrélation entre la Cryptosporidiose et le cancer colorectal.^{11,29}

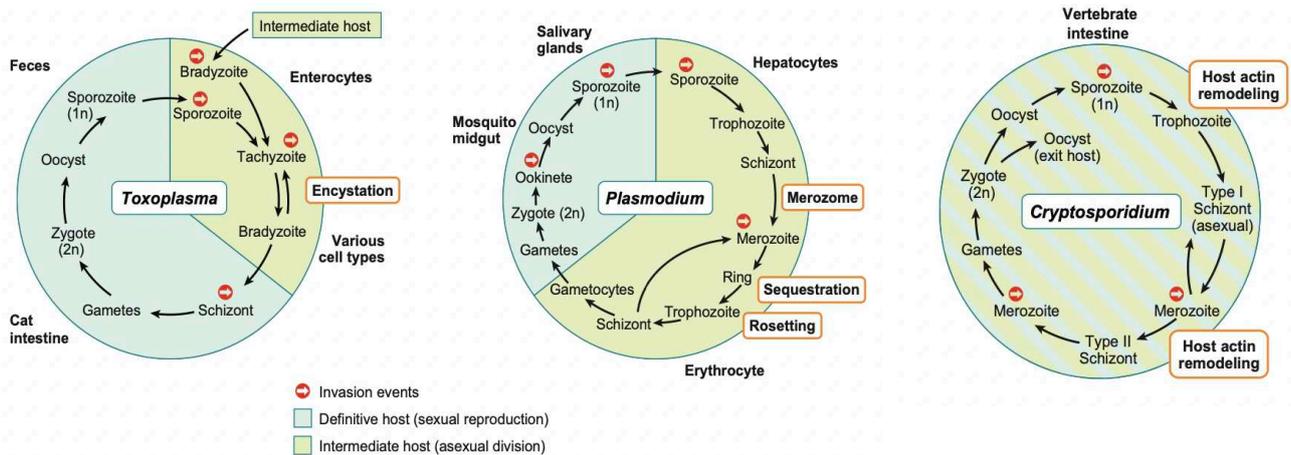


Fig. 3 : Cycle de vie de trois membres connus de la famille des Apicomplexes : *Toxoplasma*, *Plasmodium* et *Cryptosporidium*. Ce dernier est le seul à avoir un cycle dans un hôte unique. Figure extraite de l'article "Hijacking of Host Cellular Functions by the Apicomplexa"- Fabienne Plattner & Dominique Soldati-Favre

I- 3) Le cas de *Theileria annulata* :

I- 3) a. Généralités et problématiques sanitaires

La famille d'Apicomplexes du genre *Theileria* compte une dizaine d'espèces dont 4 plus connues : *Theileria equi* qui cause la piroplasmose équine ; *Theileria microti*, un parasite humain pas clairement dissocié de *Babesia microti* ; *Theileria parva* et *Theileria annulata*, transmis par les tiques aux bovins, bien que *T. annulata* puisse également infecter des cellules sanguines de moutons et de chèvres.

Theileria est un parasite qui a été décrit pour la première fois en 1898 en Afrique du Sud. Il faudra attendre 1907 pour que le Docteur Bettencourt définisse le genre *Theileira* comme une schizogonie leucocytaire.³⁰ *Theileria annulata* infecte les ruminants dans le sud de l'Europe, en Asie et en Afrique du Nord provoquant une « theilériose tropicale », qui décime le bétail en 3 semaines. Cette maladie a un lourd coût économique et agro-alimentaire ainsi qu'un impact énorme sur la production de viande et de lait. En Tunisie, entre 2500 et 3000 bovins sont contaminés par an et nécessitent un traitement, auquel s'ajoute le coût des pertes associées à la theilériose. L'impact financier est majeur pour ce pays, s'élevant à environ 3 millions d'euros.²¹ La recherche de traitements contre *T. annulata* est donc essentielle pour les pays concernés, rendant prépondérante la compréhension de l'interaction entre le parasite et ses différents hôtes.

I- 3) b. *Le cycle de vie parasitaire*

Le cycle biologique de *T. annulata* se déroule en 2 phases : la première chez la tique et la deuxième chez le bovin. Le parasite se sert des 2 organismes hôtes et les entraîne dans un cercle vicieux de transmission parasitaire. En effet, la première phase se déroule chez la tique de genre *Hyalomma*, qui s'infecte en piquant un bovin infecté par *T. annulata*. La phase de gamétogonie donnant naissance à un zygote se fait au sein des cellules intestinales de la tique, puis ce zygote se transforme en kinète mobile pour gagner les glandes salivaires de la tique. Il s'y divisera pour former un sporoblaste, puis un sporozoïte présent dans la salive de la tique. Lorsque cette dernière se nourrira à nouveau sur un bovin, elle transmettra les sporozoïtes de sa salive au sang circulant du bovin. Une fois infecté, le second hôte de *T. annulata*, voit en quelques minutes ses lymphocytes, macrophages ou monocytes infectés par les sporozoïtes qui évoluent rapidement en trophozoïtes. Au bout de deux ou trois jours, ces derniers se transforment en macroschizontes ayant deux grandes particularités : ils ont entre dix et vingt noyaux parasites par cellules hôtes et se divisent simultanément à celles-ci. Le parasite entraîne une forte division cellulaire pour se disséminer dans un grand nombre d'organes, mais une partie des parasites poursuit aussi le cycle de vie parasitaire en passant au stade de la mérogonie, ce qui fait augmenter fortement la charge parasitaire et finit par entraîner une lyse de la cellule hôte. Cette étape est corrélée à une forte fièvre chez le bovin. Les mérozoïtes relargués dans le sang vont infecter les érythrocytes et se différencier en piroplasmes. Une autre tique s'infectera à son tour, lors d'une prochaine morsure.^{4,31}

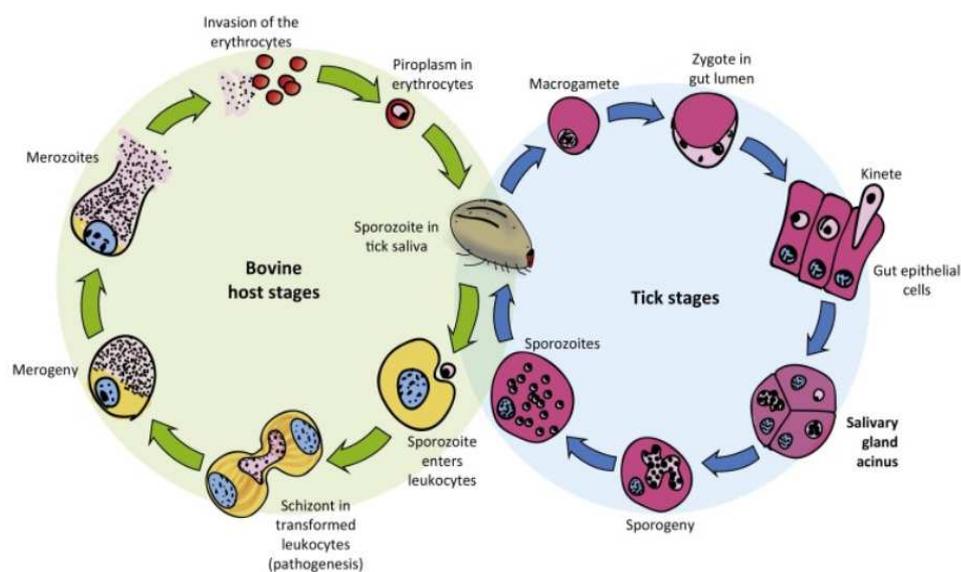


Fig. 4 : Cycle de vie de *Theileria annulata*, entre la tique et le bovin. Figure tirée de l'article « *Theileria-transformed bovine leukocytes have cancer hallmarks* » par Tretina et al., en 2015.

I- 3) c. Particularités de Theileria comparées aux autres Apicomplexes

Theileria manipule la cellule hôte à son avantage par de multiples mécanismes. Ce dernier ayant 3 grands objectifs : survivre, en empêchant la mort de la cellule hôte ; se multiplier, en entraînant une division incontrôlée des cellules infectées et enfin se répandre dans un maximum de cellules et d'organes, en augmentant les capacités invasives des cellules. Tout cela doit être fait en échappant au système immunitaire de l'hôte.

(i) La transformation de la cellule hôte :

L'infection par *T. annulata* provoque une maladie lymphoproliférative chez les vaches avec des caractéristiques cliniques similaires à certaines leucémies ou lymphomes humains. *T. annulata* infecte principalement les lymphocytes B bovins et les macrophages, tandis que *T. parva* infecte les lymphocytes B et T bovins. Les cellules infectées sont transformées et immortalisées : leur prolifération est incontrôlée, elles ont une forte capacité de migration, et de formation de métastases amenant à la formation de tumeurs et à la mort de l'animal.^{32,33} Comme décrit dans le cycle de vie parasitaire, *T. annulata* a une forte capacité de dissémination dans les cellules immunitaires bovines. L'induction du caractère invasif des cellules infectées est associée à une diminution de l'apoptose.

(ii) La réponse immunitaire face à l'infection :

Avant de pouvoir détourner les processus de la cellule hôte à son avantage, *Theileria* doit d'abord échapper au système immunitaire de l'hôte. Au cours de l'infection, le système immunitaire va produire une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires comme les interleukines IL-1/6/12 mais aussi TNF α entraînant la libération de lymphocytes T CD4⁺ non spécifiques de l'antigène parasitaire. Ces derniers produisant beaucoup d'interféron gamma et peu d'interleukine IL-2 favorisent la prolifération des macrophages. Les macrophages et les lymphocytes B sont les cellules majoritairement infectées par *T. annulata*, et leurs proliférations au cours de la réponse immunitaire, vont permettre une dissémination très rapide du parasite. L'hôte se défend alors par d'autres moyens avec la libération de « nitric oxide » par les macrophages et l'action des lymphocytes « Natural Killer » non infectés.

La mise en place de l'immunité adaptative plusieurs jours après l'infection permet d'éliminer, grâce aux lymphocytes T cytotoxiques et à la production d'anticorps, les parasites circulants ainsi qu'un grand nombre de cellules infectées.

Là encore, *T. annulata* a un moyen de défense : il empêche les lymphocytes T cytotoxiques de bien se fixer pour lyser les macrophages infectés, en diminuant les niveaux d'expression de la protéine d'adhésion CD2. La manipulation parasitaire du système immunitaire lui permet de se propager plus librement dans l'organisme du bovin.³⁴⁻³⁶

(iii) Impact de l'infection sur l'expression génique et les voies de signalisation de l'hôte

Le parasite *Theileria* influence de nombreuses voies de signalisation pour stimuler les facteurs de transcription de l'hôte. Ces derniers sont impliqués dans la prolifération, la régulation de l'apoptose pour échapper à la mort cellulaire et agissent également sur les protéines avec un rôle majeur dans le cycle cellulaire de l'hôte. Ci-après sont présentés quelques exemples de voies détournées par *T. annulata* ayant un rôle avec le phénotype transformé des cellules hôtes.

- c-Jun/JNK : Ce sont des kinases appartenant à la famille MAPKinase, qui sont impliquées dans la prolifération cellulaire, la réponse au stress, l'apoptose, la réponse inflammatoire. L'activation des kinases JNK1 et 2, et l'activation constitutive du facteur de transcription c-Jun, ne sont pas les seuls événements de phosphorylation impactés par *T. annulata*. L'infection active de nombreuses kinases, comme par exemple PI3K. La fonction de c-Jun, une fois dans le noyau, est d'activer des gènes comme la *CyclineD1* ou *MMP9*, impliqués dans l'invasion et la transformation cellulaire. En effet, une inhibition de c-Jun réduit la capacité de formations tumorales dans les cellules infectées, et une inhibition de JNK entraîne l'apoptose des cellules infectées. Cela démontre un rôle essentiel de ces kinases pour la transformation des cellules hôtes par *T.annulata*.^{4,37} Aussi JNK2 est séquestré par le parasite et forme un complexe avec la protéine parasitaire p104. Cette séquestration de JNK2 supprime l'autophagie mitochondriale mais maintient des niveaux élevés de JNK1 nucléaire, et de phosphorylation de c-Jun, démontrant un rôle majeur pour la survie des cellules infectées par *T. annulata*.³⁸

- p53 : c'est un suppresseur de tumeur, considéré comme « le gardien du génome ». p53 a des rôles majeurs dans la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire et l'apoptose.³⁹ C'est pour cela que ce facteur de transcription est très souvent retrouvé muté ou sous exprimé dans les cancers.

T. annulata a trouvé une manière qui lui est très particulière afin d'empêcher l'action de p53, en effet, plutôt que de sécréter une protéine parasitaire régulatrice de p53, il séquestre p53 dans le cytoplasme de la cellule hôte et plus précisément au niveau de la membrane du schizonte. Les mécanismes de cette séquestration restent encore inconnus. Lorsqu'on traite les cellules infectées avec un antiparasitaire, cela entraîne la libération de p53 dans le noyau, la répression de gènes anti-apoptotiques comme *Bcl-2* et l'expression de gènes pro-apoptotiques comme *BAX* ou *APAF-1*.⁵

- NFκB : ce facteur de transcription, activé par *T. annulata*, régule les voies de signalisation et l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, la prolifération et la survie cellulaires comme par exemple *c-Myc*. *T. annulata* intervient au niveau d'un régulateur clé de la voie NFκB, signalosome IKK.^{40,41} Il active constitutivement cette voie de signalisation en accumulant des agrégats d'IKK sur la surface du schizonte, comme pour p53. IKK s'activant par auto-phosphorylation, le parasite manipule et induit ainsi la voie NFκB de manière constitutive. Le recrutement du « signalosome IKK » entraîne également une dégradation continue des inhibiteurs de la voie de signalisation (IκBα et IκBβ) et une translocation de NFκB vers le noyau. Le facteur NFκB joue donc un rôle central concernant la prolifération excessive des cellules infectées par *T. annulata*. La protéine parasitaire responsable du recrutement d'IKK n'a pas encore été identifiée mais la recherche de molécules candidates pouvant inhiber la voie NFκB semble être une piste à ne pas négliger.⁴²

- c-Myc : Le facteur de transcription c-Myc est un proto-oncogène qui apparaît dans de nombreux processus cellulaires, comme la différenciation cellulaire, le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et le métabolisme.⁴³ Il est surexprimé dans de nombreux cancers humains. Au sein de l'infection par *T. annulata*, c-Myc jouerait un rôle anti-apoptotique suite à son activation et stabilisation via la voie de signalisation JAK2/STAT3. c-Myc contribue à la progression du cycle cellulaire en régulant les inhibiteurs de cdk comme p21 et également à la survie cellulaire en induisant la protéine anti-apoptotique Mcl-1. L'inhibition de *c-Myc* par siARN, inhibe la protéine Mcl-1, entraînant la mort des cellules parasitées.⁷

- miR155 : Les microARN (miR) sont impliqués dans la régulation de l'expression génique de nombreux processus cellulaires incluant ceux de l'immunité.

Les microARN sont très souvent mutés dans les cancers et ne peuvent plus jouer le rôle de régulateurs post transcriptionnels. L'oncomiR-155 est justement lié à la tumorigénèse, ainsi qu'à l'inflammation, est induit par les agents pathogènes dans le contexte de l'infection.^{44,45}

À cause de l'infection par *T. annulata*, miR-155 génère une boucle positive sur les phénotypes transformés des cellules infectées : il est induit par la voie de transformation c-Jun/AP-1, et réprime la protéine DET-1, conduisant à la stabilisation de c-Jun. L'inhibition de l'expression de miR-155 est suffisante pour perdre le phénotype transformé. Les processus entraînant l'expression continue de miR155 restent encore inconnus mais ils manipulent la régulation génique de l'hôte.

- HIF-1 α : L'effet Warburg est un remodelage métabolique se produisant dans les cellules cancéreuses, et extrêmement similaire aux caractéristiques de la transformation induite par *T.annulata*.⁴⁶ Lors de l'infection, l'expression des enzymes liées à la glycolyse augmente. Cette augmentation est due à une importante quantité d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) dans la cellule hôte et à la stabilisation d'un facteur clé du métabolisme cellulaire du cancer, HIF-1 α , induit par le statut hypoxique des cellules infectées.^{47,48} Le stress oxydatif associé à l'infection par *T. annulata* conduit à l'activation cytoplasmique de HIF-1 α qui se déplace ensuite vers le noyau (pour jouer un rôle d'initiateur épigénétique).

I- 4) Les phénomènes de sécrétion et séquestration au sein de l'interaction hôte-pathogène :

I- 4) a. La sécrétion de protéines parasitaires

(i) Les protéines Tash :

Des exemples de séquestration de protéines hôtes avec des rôles majeurs dans les processus de défense, d'apoptose et autres, ont déjà été décrit (p53, IKK ...). Le parasite induit un grand nombre de changements notamment associés à la transformation de la cellule hôte que les phénomènes de séquestration seuls ne peuvent expliquer. De nombreuses protéines parasitaires sont donc probablement sécrétées du cytoplasme vers le noyau pour agir directement sur les voies de signalisation de l'hôte et entraîner le phénotype transformant des cellules hôtes.

Ce type de protéine a déjà été décrit, c'est le cas des TashAT (AT hook DNA-binding protein)⁴⁹, dont la fonction reste inconnue.

Plus tard en 2004 et 2007, respectivement Shiels et Schneider^{50,51}, identifient pour l'un, une autre TashAT, SuAT1, qui aurait un rôle dans la morphologie de l'hôte au cours de la différenciation parasitaire ; pour l'autre, la protéine TaSE qui interagit avec les microtubules, impliquant un rôle dans la dissémination du parasite dans les cellules filles au cours de la division de l'hôte.

(ii) La protéine TaPin1 :

La plus récente protéine sécrétée s'appelle TaPin1(TA18945), et a été découverte parmi une liste de 33 protéines potentiellement sécrétées par le parasite. Cette prolyl-isomérase est sécrétée dans la cellule hôte et module les voies oncogènes PKM2-HIF1 mais également FBW7/c-Jun jouant sur la transformation et reproduisant un effet Warburg. TaPin1 déstabilise l'ubiquitine ligase FBW7 de l'hôte, provoquant son auto dégradation et la libération de c-Jun, impliquée dans la transformation cellulaire. *T. annulata* a donc la capacité de modifier l'expression des gènes bovins via des sécrétions de protéines parasitaires, régulant ainsi la transformation de la cellule.^{52,53}

(iii) Une protéine inconnue impactant la tumorigénèse

Il existe un autre exemple de modifications de l'expression de gènes de l'hôte associées à l'infection, et probablement dû à une protéine sécrétée, mais cette dernière n'a pas encore été caractérisée. En effet, l'infection induit l'activation de la méthyltransférase bovine SMYD3, qui en se fixant à son promoteur, entraîne la surexpression du gène *MMP9* en se fixant et en méthylant son promoteur.

Ce dernier code pour une métalloprotéase qui a des rôles clés dans la métastase tumorale et l'angiogenèse.⁵⁴ (cf Introduction partie II-2-a)

Il existe des exemples équivalents de manipulation des cellules hôtes, via des protéines parasitaires sécrétées dans le noyau de l'hôte, par d'autres agents pathogènes tels que les bactéries, les virus ou les champignons. L'analyse des différentes stratégies utilisées par les parasites offre d'importantes informations sur les mécanismes de l'interaction hôte-pathogène et peut mettre en évidence des cibles potentielles de médicaments antimicrobiens.

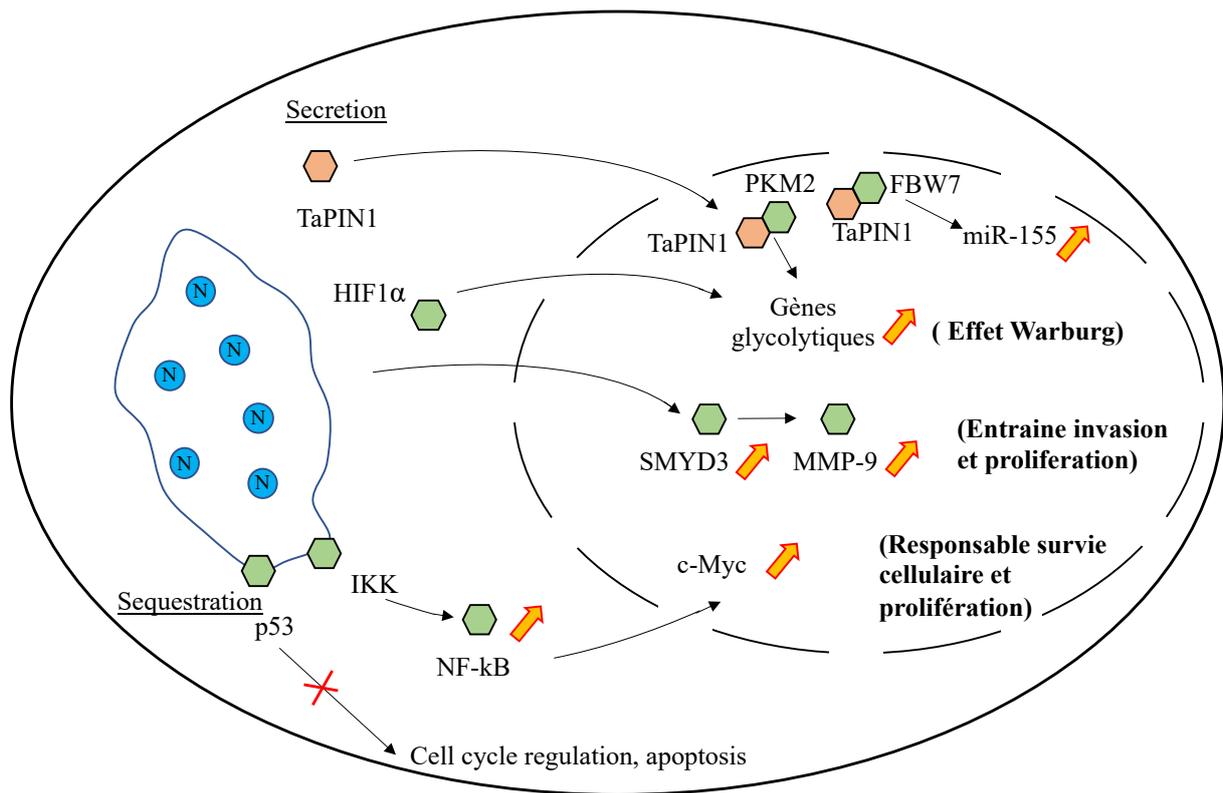


Fig. 5 : Représentation schématique des différentes stratégies utilisées par *Theileria annulata* pour détourner les machineries hôtes. (Hexagone orange : protéines parasites ; hexagone vert : protéines hôtes) Figure réalisée avec Ivan Ktorza.

I-4) b. La séquestration des protéines hôtes

Chaque parasite Apicomplexes a développé des stratégies précises pour influencer sur la régulation des gènes de l'hôte. *T. annulata* sécrète des protéines parasitaires dans le noyau de l'hôte mais il séquestre également des protéines de la cellule hôte et des complexes de signalisation à la surface du schizonte pour générer un « signalosome ». ^{40,55}

(i) CLASP1 et ses interacteurs :

Des protéines hôtes, en plus de p53 ou IKK, sont séquestrées par le parasite. *T. annulata* utilise la machinerie de division de la cellule hôte en interagissant avec les microtubules afin d'assurer sa répartition dans les cellules filles. ⁵⁶ L'étude de Kerry Woods a montré que la protéine bovine CLASP1 était séquestrée par *T. annulata*. CLASP1 régule l'attachement des microtubules aux kinétochores et positionne le fuseau mitotique.

En inhibant ou en surexprimant CLASP1, il a été montré que ce dernier est nécessaire et suffisant pour la bonne répartition et localisation du parasite dans la cellule hôte.

De plus, grâce à une technique de BioID (proximity-dependent biotinylation identification), combinée avec des co-immunoprécipitations, des protéines hôtes ou parasitaires interagissant avec CLASP1 ont pu être découvertes.

Notamment, un complexe protéique contenant CLASP1/CD2AP/EB1 qui entoure le schizonte tout au long du cycle cellulaire hôte (cf Annexe 3), auquel se rajoute des protéines adaptatrices bovines comme CIN85, 14-3-3 epsilon (et d'autres isoformes) et ASAP1.^{57,58} Ces dernières n'ont pas forcément d'activité catalytique, elles ont un rôle central dans les transductions du signal ou la communication cellulaire, grâce à leurs domaines de liaison à d'autres protéines qui facilitent la formation de grands complexes de signalisation.⁵⁹ Ce grand complexe comprend également plusieurs protéines parasitaires : Ta-p104, une protéine de la membrane plasmique (TA03615) et TaMISHIP (TA20980) interagissant avec le domaine SH3 de CD2AP, et ayant un potentiel rôle dans la cytokinèse. La protéine parasitaire TaSP (*Theileria annulata* Surface Protein), elle aussi séquestrée à la surface parasitaire, colocalise avec le MTOC (centre d'organisation des microtubules) des cellules infectées par *T. annulata* et interagit également avec la gamma-tubuline, laissant penser à une implication de TaSP dans la régulation de l'assemblage des microtubules de la cellule hôte.^{51,60}

(ii) L'ultrastructure de la surface parasitaire permettant cette séquestration :

Dans une autre étude, Kerry Woods et Andrew Hemphill décrivent l'ultrastructure de la surface parasitaire en utilisant la microscopie électronique à transmission.⁶¹ Ils ont découvert des membranes poreuses, appelées « lamelles annulaires » ou « annulate lamellae » (AL), associées à la surface du schizonte de *T. annulata*. Ces structures membranaires ont été observées il y a plus de soixante ans, notamment dans des cellules à prolifération rapide (cancéreuses, embryonnaires...) mais leur fonction demeure inconnue.⁶¹ Un complexe de protéines, marqueur des pores nucléaires, a été montré comme séquestré à la surface parasitaire grâce à un anticorps anti-Nucleoporine, maB414. Il est maintenant utilisé comme marqueur des AL : son signal est retrouvé entre les noyaux parasitaires mais marque également l'enveloppe nucléaire de l'hôte. D'autres protéines impliquées dans le transport nucléaire, la dynamique des microtubules, ou ayant une activité kinase ont également été découvertes comme séquestrées à la surface du parasite c'est le cas de l'Importine B1, RanGAP1, PLK1, EB1...^{56,62}

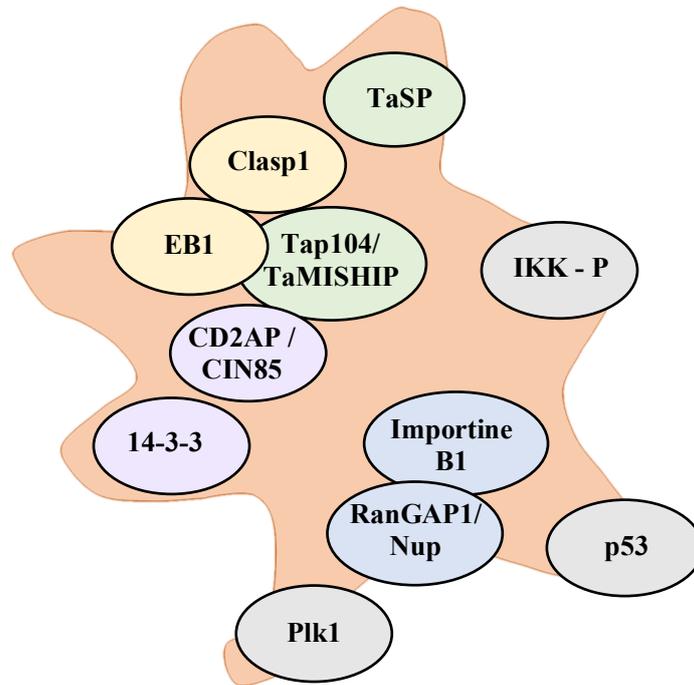


Fig. 6 : Représentation graphique des interactions hôte-parasite sur la surface du schizonte de *Theileria annulata*. Le parasite est représenté en orange. Les protéines parasitaires associées à la surface du parasite (Ta-p104, TaMISHIP, TaSP) sont indiquées en vert. Les protéines hôtes associées aux microtubules (CLASP1), ou liant le parasite (EB1), sont représentées en jaune. Les protéines adaptatrices (CD2AP, CIN85 et 14-3-3) sont représentées en violet, et les protéines impliquées dans le transport nucléaire (RanGAP1, Nup et Importin B1) sont représentées en bleu. L'association dépendante du cycle cellulaire de Plk1 avec le schizonte et le recrutement du complexe signalosome IKK phosphorylé et de p53 sont représentés en gris. Figure inspirée de l'article de Sandra Huber et Kerry Woods, 2017.

I- 5) Diagnostics et traitements de *Theileria annulata*

(i) Les signes cliniques :

Il y a différentes manières de diagnostiquer une infection à *T. annulata*. Tout d'abord, les signes cliniques sont multiples : le bétail est anémié dû à la lyse des globules rouges, fortement anorexique dû à une diarrhée hémorragique, avec des pétéchies dans les muqueuses et également une fièvre pouvant atteindre 42°C. Dans la phase finale de la maladie, les cellules infectées sont présentes dans les tissus lymphoïdes mais aussi non-lymphoïdes. Ces symptômes combinés à une hypertrophie des nodules lymphatiques, provoquent la mort du bovin, un mois maximum après l'apparition de ces derniers. La santé de l'animal ainsi que son mode d'élevage ont un rôle important dans l'apparition de la maladie, les tiques préférant la chaleur des étables.

La survie du bovin dépendra aussi de la virulence de la souche de *T. annulata*, du nombre de morsures de tiques, et de parasites injectés.²¹

(ii) Le dépistage :

Différents tests existent pour dépister un bovin atteint de theileriose :

- des frottis sanguins ou étalement des nœuds lymphatiques avec coloration Giemsa ;
- des immunofluorescences indirectes ;
- des techniques ELISA « Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay » ;
- des « Reverse Line Blot » , amplification des séquences 16S ribosomales ;
- des PCR « polymerase chain reaction » avec des amorces spécifiques pour détecter le gène codant pour l'antigène Tams-1 (*Theileria annulata* merozoite antigen) ;
- des dépistages en 10 minutes, avec sérologie de l'antigène TaSP ou des anticorps anti-TaSP.

(iii) Les traitements et prévention :

La lutte contre *T. annulata* peut se faire au niveau de la tique ou du bovin : dans les étables, des acaricides sont utilisés pour éliminer larves et tiques ; les bovins sont aussi traités avec des theilericides pour éliminer le parasite. Il n'existe malheureusement qu'un seul traitement contre *Theileria*, une hydroxynaphtoquinone appelée Buparvaquone (BW720c).⁶³

Cette dernière a pour cible la protéine sécrétée TaPin1, permettant l'élimination des cellules infectées et la survie du bovin. Des phénomènes de résistance à la Buparvaquone ont été identifiés, soulevant un besoin urgent de nouveaux traitements anti-theilerial.⁶⁴

Les souches résistantes à la Buparvaquone possèdent une mutation dans le gène parasitaire TaPin1, ce qui empêche le composé de cibler correctement cette protéine parasitaire sécrétée dans le noyau de l'hôte.⁶⁴ Enfin, il existe une méthode de vaccination avec des parasites vivants atténués après plusieurs centaines de passages de lignées lymphocytaires infectées.⁶⁵ Des vaccins avec seulement des antigènes parasitaires ont aussi été testés mais leur efficacité étant partielle, la recherche de vaccins contre *Theileria* doit encore progresser. Il existe donc une réelle nécessité à découvrir de nouvelles molécules contre *Theileria*.

De plus, les parasites peuvent sécréter des protéines dans le cytoplasme de l'hôte pour orchestrer des changements stables et durables de l'activité du génome de l'hôte, en l'absence de changements dans la séquence d'ADN. Ces phénomènes au sein de l'interaction hôte-pathogène sont caractérisés comme des « modifications épigénétiques ».

II- Rôle de l'épigénétique lors de l'infection

II-1) La machinerie épigénétique

II-1) a. Histoire et définition de l'épigénétique

L'épigénétique explore les changements dans l'expression des gènes et l'apparition de nouveaux phénotypes sans modification de la séquence d'ADN.

Durant la même décennie où Watson, Crick et Franklin ont déchiffré la structure de l'ADN en tant que modèle d'information génétique, Conrad Waddington a introduit la notion d'épigénétique comme « la biologie qui étudie les relations de cause à effet entre les gènes et leurs produits faisant apparaître de nouveaux phénotypes ». ^{66,67} Aujourd'hui, l'épigénétique est souvent définie comme « des modifications héréditaires transmissibles entre générations, sans impact sur la séquence d'ADN nucléotidique ». Les causes de ces modifications sont multiples et appelées « environnementales » : l'alimentation, le stress, la pollution, le tabagisme...

Les travaux des dernières décennies ont montré comment les mécanismes épigénétiques régulent l'expression des gènes, ainsi que de nombreux mécanismes de plasticité des phénotypes cellulaires. La compréhension de la coordination des programmes d'expression des gènes par des signaux environnementaux nouvellement intégrés est donc relativement récente et ouvre de nombreuses perspectives pour l'avenir.

Les mécanismes épigénétiques fonctionnent à plusieurs niveaux, régulant de nombreux événements cellulaires, notamment l'expression des gènes, la réparation de l'ADN, la réplication du génome... Les facteurs épigénétiques peuvent avoir un impact sur l'organisation de l'ADN nucléaire : ils jouent sur la méthylation de l'ADN et des histones afin de modifier l'expression des gènes, entraînant des changements de conformation de la chromatine et de l'architecture chromosomique.

L'expression des gènes est régulée par différents acteurs épigénétiques, comme de courts ARNs non codants, ou encore des enzymes spécialisées régulant le passage de la chromatine d'un état condensé, à un état décondensé et inversement, selon le besoin d'expression du gène. Les interactions fonctionnelles entre les facteurs de transcription liés à l'ADN et les acteurs épigénétiques, coordonnent l'accessibilité du génome et l'expression génique. ⁶⁸

II-1) b. L'état chromatinien dépend des modifications sur les histones et l'ADN

Les acteurs épigénétiques peuvent agir à différents niveaux notamment sur l'ADN et les histones, et sont hautement conservés tout au long de l'évolution. En effet, l'ADN peut être méthylé sur les cytosines conduisant à une répression génique.⁶⁹ La méthylation n'est pas limitée à l'ADN, cette modification existe également sur les résidus de lysine au niveau des séquences N-terminales des protéines histones. Elle fait partie d'une longue liste de modifications post-traductionnelles (PTM) qui régulent l'expression des gènes. Ces PTM sont entre autres la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination... Ensemble, elles constituent le « code épigénétique ». Ces modifications peuvent être maintenues de manière stable, mais sont également potentiellement réversibles et dynamiques. Elles contribuent aux processus de remodelage de la chromatine qui affectent la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN. Ces PTM influencent la structure de la chromatine et l'expression locale des gènes.⁷⁰ L'état de compaction et l'organisation spatiale de l'ADN vont impacter l'accessibilité de certains endroits du génome et par conséquent la transcription. C'est donc l'état de condensation de la chromatine qui va dicter ou non l'expression des gènes.

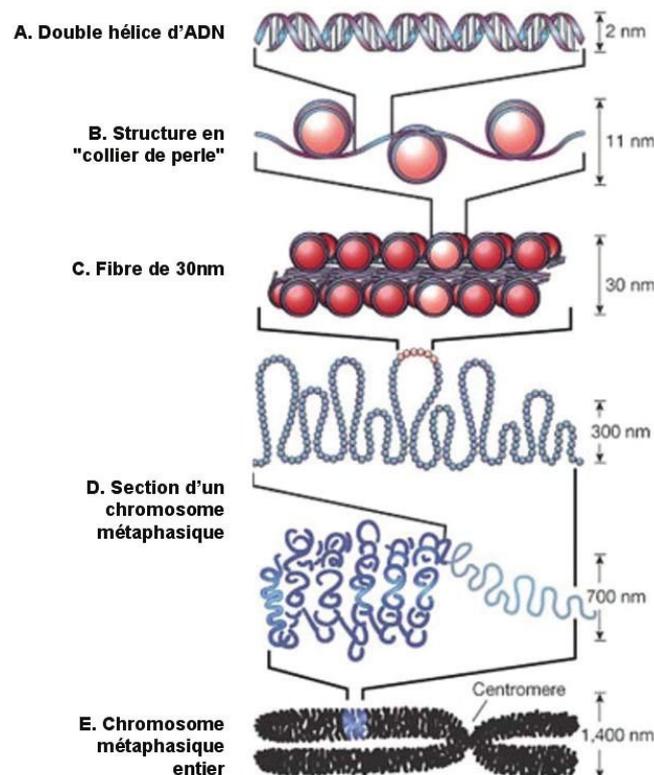


Fig. 7 : Association de l'ADN avec des octamères d'histones pour former une fibre de 11nm adoptant une structure en "collier de perle". Niveaux de compaction supérieurs de la chromatine en fibre de 30nm. Un chromosome est un enroulement plus ou moins condensé de nucléosomes. Figure extraite de la thèse "Molecular studies of functional interactions between Polycomb mediated silencing and gypsy insulators in flies"

La chromatine a été découverte en 1880 par Flemming, et décrite comme un enchainement de nucléosomes. Un nucléosome est composé d'un octamère d'histones avec deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3, et H4 autour desquels l'ADN est enroulé. L'ajout de l'histone H1 permet d'augmenter la compaction de la chromatine.

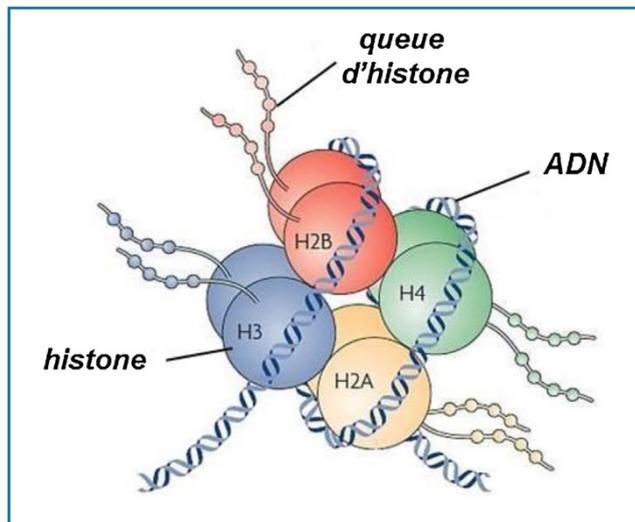


Fig. 8 : Un nucléosome est composé d'un octamère d'histones autour duquel est enroulé le brin d'ADN.

Figure extraite de l'article « Environnement périnatal : marques épigénétiques et déterminisme des maladies métaboliques de l'adulte. »

Les PTM situées sur les queues d'histone dépassent de la structure du nucléosome.

La forme « ouverte » de la chromatine, appelée euchromatine est associée à l'expression des gènes, avec comme caractéristiques des marques d'histone activatrices et une faible méthylation de l'ADN.⁷¹ En revanche, l'hétérochromatine est fermée et associée à des marques d'histones répressives et à de l'ADN méthylé, donc moins accessible aux facteurs de transcription. L'ajout de méthylation au niveau de l'ADN verrouille la répression génique.⁷¹

Ces PTM peuvent être retrouvées au niveau des promoteurs des gènes ou du corps des gènes, impactant différemment l'expression génique. Elles ont également des cibles non histones, impactant la fonction de la protéine modifiée.⁷² C'est par exemple le cas de l'enzyme SMYD3, jouant un rôle central dans le cancer et qui méthyle la kinase MAP3K2.⁷³

En plus de la méthylation de l'ADN, des modifications des histones et de l'organisation de la chromatine, il existe aussi des mécanismes impliquant la régulation post-transcriptionnelle du génome. Cela inclut de courts ou longs ARN non codants (ARNnc) qui contribuent aux états de la chromatine, ou des microARN (miARN) qui ciblent des transcrits spécifiques.

II-1) c. La méthylation des lysines : un des acteurs de modifications post-traductionnelles

Dans cette thèse, nous nous concentrons sur la méthylation des lysines des protéines histones. La méthylation est une PTM dynamique et polyvalente qui semble cruciale au sein des infections pathogènes.⁷⁴

Un grand nombre d'études sur la méthylation des lysines au niveau des queues d'histones, ont souligné le rôle majeur de cette marque dans le destin cellulaire. Les chercheurs ont caractérisé de nombreuses enzymes épigénétiques pouvant contrôler l'expression des gènes grâce à la marque épigénétique qu'elles modulent.

Il existe 3 types de protéines : celles qui vont catalyser la PTM que l'on appelle « writers », celles qui l'enlèvent que l'on appelle « erasers » et celles qui lisent l'information que l'on appelle « readers ». Ces dernières sont des protéines nucléaires capables de se lier spécifiquement à une PTM pour « lire puis traduire » le méthylome en expression génique.

Pour l'acétylation, les « writers » sont les acétyltransférases (HAT), générant des marques activatrices et les « erasers » responsables de la déacétylation sont des désacétylases (HDAC). Pour la méthylation, elle est réalisée par des « lysines méthyltransférases » (KMT), qui sont les « writers », pouvant être spécifiques à une seule lysine et générer des mono-di ou triméthylation avec des effets distincts sur l'expression des gènes.⁷⁵

Selon le résidu lysine modifié, la méthylation peut conduire à un état euchromatinien, permettant la transcription, par exemple H3K4, K36, K79 ou à un état hétérochromatinien, répressif, associé à la méthylation des histones comme pour H3K9, K27, H4K20.^{70,71}

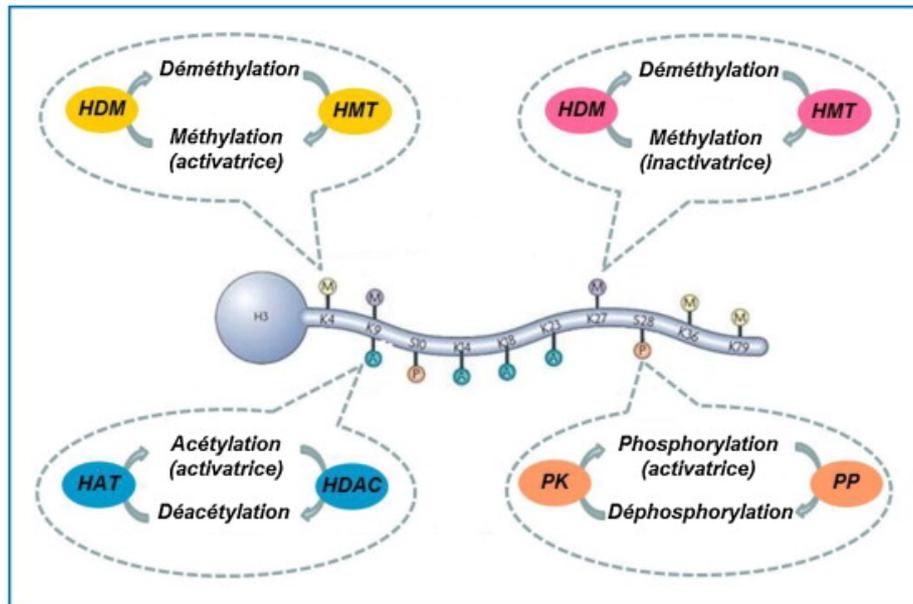


Fig. 9 : Panel de modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la phosphorylation et la méthylation des lysines (activatrice ou inhibitrice) sont réalisées par des histones méthyltransférases (HMTs) et éliminées par des histones déméthylases (HDMs). L'acétylation est assurée par des histones acétyltransférases (HATs) et éliminée par des histones désacétylases (HDACs). La phosphorylation est catalysée par des protéines kinases (PK) et éliminée par des protéines phosphatases (PP). K : résidu lysine ; S : résidu sérine.

Figure extraite de l'article « Environnement périnatal : marques épigénétiques et déterminisme des maladies métaboliques de l'adulte. »

Les histones méthyltransférases contiennent le plus souvent un « domaines SET » incluant les protéines Su(var), Polycomb et Trithorax mais aussi des protéines ne possédant pas de domaine SET comme DOT1, qui toutes deux catalysent la réaction de méthylation.⁷⁶ Elles nécessitent un cofacteur SAM (S-Adénosylméthionine), donneur de méthyle, pour transférer les résidus méthylés sur les lysines des queues d'histones.⁷⁵

La déméthylation est réalisée par des « lysines déméthylases » (KDM), spécifiques à chaque marque de méthylation des histones. Ces enzymes « erasers » retirant les méthylations, comprennent deux familles : LSD1 (lysine spécifique déméthylase 1), amines oxydases FAD dépendantes et les hydroxylases dépendantes du Fe(II)/ α -cétoglutarate à « domaine Jumonji (Jmj-C) ». Le rôle de toutes ces enzymes commence à être bien connu, pourtant assez peu caractérisé au cours de maladies infectieuses.

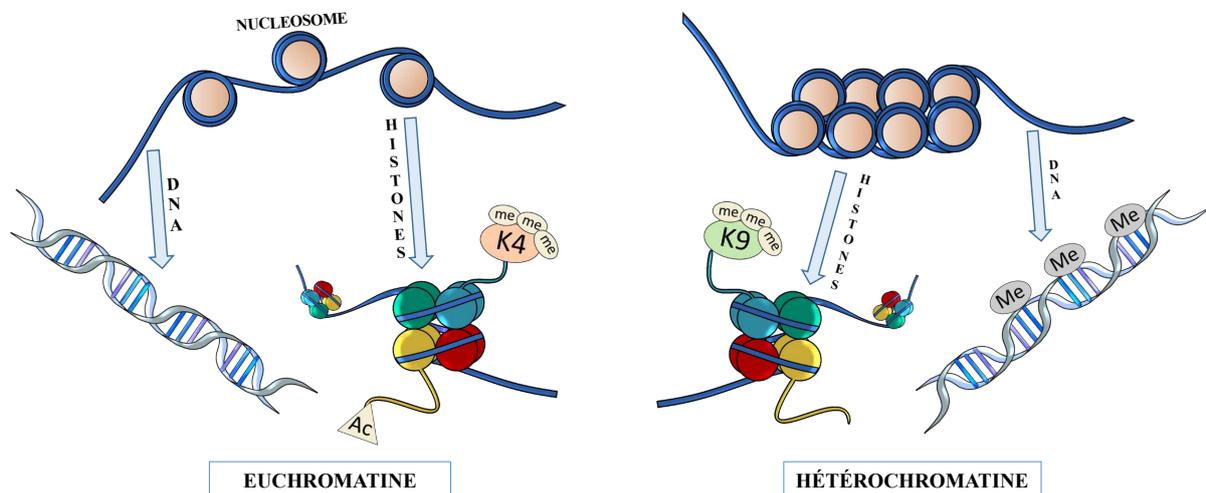


Fig. 10 : Régulation des états chromatinien : la chromatine ouverte conduisant à un état transcriptionnel actif, est caractérisée par des marques actives de méthylation des histones (H3K4me3 ou H4K20me), des queues d'histones acétylées et un ADN non méthylé ; l'hétérochromatine condensée correspond à un état transcriptionnel réprimé caractérisé par des marques répressives de méthylation des histones (telles que H3K9me3 ou H3K27me3), des queues d'histones désacétylées et un ADN méthylé.

Peu de choses sont connues sur le rôle des histones méthyltransférases ou déméthylase au sein de l'infection (il en est de même pour les autres PTM). Nous émettons l'hypothèse que les mécanismes épigénétiques peuvent jouer un rôle central dans la dynamique des interactions hôte-parasite. Ces derniers pourraient entraîner des changements stables et durables au niveau du génome de l'hôte et en absence de modification au niveau de l'ADN.

II-2) L'impact de l'épigénétique au cours de l'infection

Les événements épigénétiques dans le noyau de la cellule hôte entraînent des modifications de la méthylation de la chromatine de l'hôte et donc des changements stables de l'expression des gènes de ce dernier. L'épigénétique régule l'expression génique, et joue un rôle majeur indéniable dans de nombreuses pathologies, les infections pathogéniques ne font pas exception. L'épigénétique des pathogènes est de plus en plus étudiée pour comprendre comment ces organismes tirent profit de leur hôte. Nous allons nous concentrer sur les infections parasitaires et montrer que l'épigénétique de l'hôte va également être modifiée par l'agent pathogène. Cela entraînera de nombreux changements dans les profils d'expression des gènes de l'hôte. Grâce à ces processus très avancés, l'infection va détourner les voies de signalisation de l'hôte pour en tirer profit. Les parasites peuvent orchestrer des changements stables, et durables dans le génome de l'hôte, sans changement dans la séquence d'ADN. Les cellules hôtes se divisent en conservant toutes ces modifications : c'est l'épigénétique des interactions hôte-pathogène. Cela ne concerne pas seulement les parasites Apicomplexes, par exemple, le parasite *Leishmania* est capable de diminuer l'expression des activateurs de l'inflammasome et parallèlement d'activer des régulateurs négatifs de ce dernier : de cette façon, il contourne la réponse immunitaire. *Leishmania*, en manipulant l'épigénétique de l'hôte, échappe ainsi au système immunitaire et s'installe dans les macrophages.^{77,78}

De nouvelles découvertes suggèrent un rôle crucial de la méthylation des lysines, événement dynamique dans l'infection par les Apicomplexes : ces modifications post-traductionnelles ont clairement pour rôle d'aider le parasite à détourner la cellule hôte à son avantage. L'étude de leur fonction dans les cellules hôtes et dans le parasite, peut aider à une meilleure compréhension de l'infection. En effet, le parasite peut également ajuster sa propre épigénétique au cours de son cycle de vie⁷⁹ ; il est donc important pour éradiquer l'infection de comprendre son fonctionnement et de trouver la cible de ces enzymes parasitaires spécifiques. Les changements métaboliques implantés par le parasite restent-ils intacts même après l'infection ?

II-2) a. Détournement de la machinerie épigénétique et manipulation de l'expression des gènes de l'hôte par le parasite

Dans une revue précédente, écrite au laboratoire, nous avons montré que les parasites induisent des voies de signalisation de la cellule hôte via des modifications de la chromatine et des programmes transcriptionnels.⁵⁵

Décrire tous les processus cellulaires installés par les parasites entraînant des modifications stables de l'expression des gènes est un véritable défi. Nous nous sommes focalisés sur les exemples où les parasites ciblent la méthylation des lysines, un événement dynamique dans la régulation de l'épigénome de l'hôte, pouvant provoquer des effets positifs et négatifs sur l'expression génétique.^{17,80,81}

Nous avons choisi de mettre en avant 6 stratégies différentes, qui ne sont qu'un extrait du panel d'événements épigénétiques ayant lieu dans le noyau de l'hôte, causés par l'agent pathogène. Nous présentons comment *Theileria annulata* est un modèle unique d'étude de l'épigénétique des interactions hôte-parasite. Il induit des microARN de l'hôte pour réguler l'oncogénèse mais également une enzyme épigénétique de l'hôte qui va déposer une marque de méthylation sur le promoteur d'un gène impliqué dans la transformation cellulaire, MMP9. Certaines protéines parasitaires sécrétées vont également impacter des voies de signalisation de l'hôte. Ce qui est aussi le cas chez *Toxoplasma*, mais ses effecteurs sécrétés ciblent aussi des complexes chromatinien ou entraînent directement la répression de certains gènes de l'hôte. Le parasite *Cryptosporidium* va plutôt directement sécréter des transcrits ciblant les enzymes épigénétiques de l'hôte. Il y a encore de nombreuses stratégies à explorer, notamment l'ajout de PTM sur des protéines hôtes non-histones, leur retirant leur fonction. Agir à l'avenir sur ces mécanismes épigénétiques pour éliminer les agents pathogènes semble être une piste essentielle de traitement. Ces stratégies sont détaillées dans notre revue "*The clever strategies used by intracellular parasites to hijack host gene expression*" publiée en Janvier 2020.⁷⁴

Il existe encore certains mécanismes non documentés dans la littérature, comme par exemple sur les protéines sécrétées par un parasite qui agissent directement comme des enzymes épigénétiques dans le noyau de l'hôte. (cf Fig 4 revue, Annexe1). Aussi, nous n'avons vu aucun cas impliquant des lysines déméthylases dans l'interaction hôte-parasite, bien que nous prévoyions qu'il en existe aussi. Il en est de même pour la méthylation de l'ADN et cela mériterait d'être approfondi.

II-2) b. Le rôle majeur de la machinerie épigénétique parasitaire pour l'infection

En plus d'agir sur l'épigénétique de la cellule hôte, les Apicomplexes ont la capacité de modifier leurs propres épigénomes et d'effectuer des modifications d'histones parasitaires.

(i) *Plasmodium*, le parasite du paludisme a ses propres méthyltransférases et déméthylases : 10 protéines à domaine SET ont montré des activités KMT, dont quatre PfSET1, -2, -3 et -8 qui méthylent respectivement H3K4, H3K36, H3K9 et H4K20.⁸² Ces marques d'histones changent au cours du cycle érythrocytaire asexué du parasite, elles sont donc probablement très importantes pour réguler l'expression des gènes parasitaires. *P. falciparum* utilise la variation antigénique à la surface des globules rouges infectés pour échapper au système immunitaire de l'hôte et adhérer à la microvascularisation, déclenchant la maladie.²⁴ C'est une famille de molécules de surface codées par environ 60 gènes var, PfEMP1, qui est responsable de ces variations.^{23,83} Le génie de ce parasite est sa capacité à exprimer un gène var dans une cellule à un moment donné, en faisant taire l'expression des autres. La biologie de la PfPKMT est très étudiée pour trouver des inhibiteurs au niveau de ces enzymes.

(ii) Chez *Toxoplasma*, les exemples de modifications des histones impactant l'expression du génome sont nombreux. Il possède de manière surprenante une enzyme apparentée à Set8, normalement limitée aux métazoaires. Des analyses biochimiques montrent que TgSet8 est responsable de la mono/di/triméthylation de H4K20 alors qu'il n'existe que H4K20me chez l'Homme.⁸⁴ Cette marque est représentative de l'hétérochromatine chez les parasites Apicomplexa. *T. gondii* a également la capacité de méthyler l'arginine et c'est le seul de son phylum à avoir plusieurs histones acétyltransférases GCN5. De plus, il réalise différentes modifications de H4K31, cruciales pour l'organisation du génome du parasite. Les pathogènes *T. gondii* et *P. falciparum* ont une machinerie épigénétique très proche. En effet, la marque d'histone H4K31 acétylée a été trouvée au niveau des promoteurs et elle est essentielle pour l'expression des gènes chez ces deux parasites. Chez *T. gondii*, la méthylation de H4K31 est plus présente sur le corps du gène et anti-corrélée avec la transcription. H4K31me est également enrichie au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique dans *P. falciparum* conduisant à des loci de transcription non permissive. Cette marque histone, comme l'autre marque répressive H3K9me3, ne se retrouvent pas dans les régions subtélomériques.⁸⁵

Enfin, une nouvelle lysine méthyltransférase apicale de *Toxoplasma* a été montrée comme étant un facteur important pour la propagation et l'invasion des parasites.

Cette enzyme AKMT (Apical lysine methyltransferase) a été découverte pour jouer un rôle dans la motilité du parasite. En effet, *Toxoplasma gondii* est capable de basculer entre un état mobile et non mobile respectivement pour l'invasion ou la réplication. Ce processus est régulé par des événements épigénétiques. L'absence d'AKMT inhibe la motilité, et par conséquent altère gravement le cycle lytique. La particularité de cette lysine méthyltransférase est sa dimérisation qui est cruciale pour l'activité enzymatique et la sortie du parasite de la cellule hôte.⁸⁶

(iii) L'exploitation du génome de *T. annulata* a identifié des acteurs épigénétiques potentiels de la méthylation chez le parasite. Ce dernier a 5 KMT à domaines SET et 2 KDM ayant des domaines Jumonji, prédits. Concernant ces histones déméthylases, la présence d'homologues de LSD1 est discutable, l'analyse BLAST et la phylogénie montrent que certaines régions sont conservées et présentent une similarité de séquence. Ce faible nombre d'enzymes épigénétiques s'explique par un petit génome avec seulement 3845 gènes (8,4Mb sur 4 chromosomes).

Il n'y a pas beaucoup de connaissances et de données sur le remodelage de la chromatine et les modifications des histones chez *Theileria annulata*. Une récente étude faite au laboratoire a permis de découvrir une marque histone spécifique au parasite H3K18me1, et de caractériser une protéine à domaine SET, responsable de cette PTM, appelée TaSETup1. En empêchant la déméthylation de H3K18me, le passage du parasite en mérogonie est bloqué ; cette marque joue un rôle majeur dans le cycle de vie parasitaire. H3K18me1 est retrouvé sur les corps des gènes réprimés au stade schizonte. La marque épigénétique H3K18me1 diminue quand le parasite est au stade mérozoïte. H3K18me contrôle l'expression génique au stade schizonte et la différenciation parasitaire chez *Theileria annulata*.⁷⁹

Les modifications de l'épigénome de l'hôte dues à l'infection et la présence de mécanismes épigénétiques chez les parasites Apicomplexes font de la recherche d'inhibiteurs d'enzymes épigénétiques une évidence comme de potentiels traitements anti-parasitaires. Les techniques de cartographie des modifications épigénomiques progressant rapidement, elles permettront bientôt une étude plus complète du rôle de l'épigénome dans les maladies infectieuses et d'établir un lien entre l'infection parasitaire, les modifications du transcriptome et les modifications épigénétiques.

II-3) L'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes épigénétiques :

II-3) a. *L'inversion des modifications épigénétiques : une stratégie thérapeutique intéressante*

Il existe de nombreuses petites molécules inhibitrices pour bloquer, par exemple, les activités de KMT et de KDM. Nous nous demandons si ces molécules, principalement développées pour traiter les cancers et dont le nombre ne fait qu'augmenter, pourraient être repositionnées contre les maladies infectieuses.⁸⁷ La découverte de médicaments qui ciblent ces protéines pourrait empêcher les modifications épigénétiques participant à la virulence et la survie des parasites.⁸⁸

Le cancer est caractérisé à la fois comme une maladie génétique et épigénétique. De nombreuses enzymes épigénétiques sont dérégulées au cours de cette maladie et sont associées à la tumorigenèse. Par exemple, les enzymes responsables des modifications post traductionnelles sur les histones sont souvent mutées ou surexprimées, et l'ADN est hypométhylé.⁷² A l'heure actuelle, 2 grandes familles ont été étudiées en test clinique : les molécules inhibant la méthylation de l'ADN (inhibiteurs d'ADN méthyltransférases) et les molécules ciblant les histones (principalement inhibiteurs d'histones déacétylases ou déméthylases).^{88,89}

En effet, cibler l'épigénétique pour traiter une maladie semble être une piste de traitement prometteuse pour l'avenir. Les changements génétiques sont majoritairement irréversibles, il est donc très difficile de modifier la séquence ADN dans les milliards de cellules dont notre corps est composé. Les changements épigénétiques sont réversibles, et régulent les enzymes permettant l'activation ou la répression d'un gène. Il doit donc être possible de corriger les marques épigénétiques anormales responsables de maladies. Cette stratégie thérapeutique innovante entraîne le déploiement d'importants efforts dans les laboratoires pour identifier, élaborer, puis tester des inhibiteurs d'enzymes épigénétiques : ils sont appelés des « épimédicaments ». Cette panoplie de petites molécules peut être « repositionnée » pour d'autres maladies où l'épigénétique pourrait jouer un rôle important.

Les enzymes épigénétiques sont essentielles dans les interactions hôte-parasite et les traitements anticancéreux pourraient fournir de nouvelles thérapies pour les maladies infectieuses. De plus, la collection croissante de molécules inhibitrices offre un arsenal inexploité pour développer des traitements antiparasitaires.

Cette hypothèse a déjà été soulevée au cours de l'infection par le parasite *Leishmania*, pour lequel les thérapies actuelles ont une grande limite : les problèmes de résistance.

Ils démontrent la nécessité de trouver de nouvelles stratégies d'élimination parasitaire, ne ciblant pas directement ce dernier, mais plutôt l'interaction hôte-pathogène ou l'épigénétique de l'hôte.⁹⁰

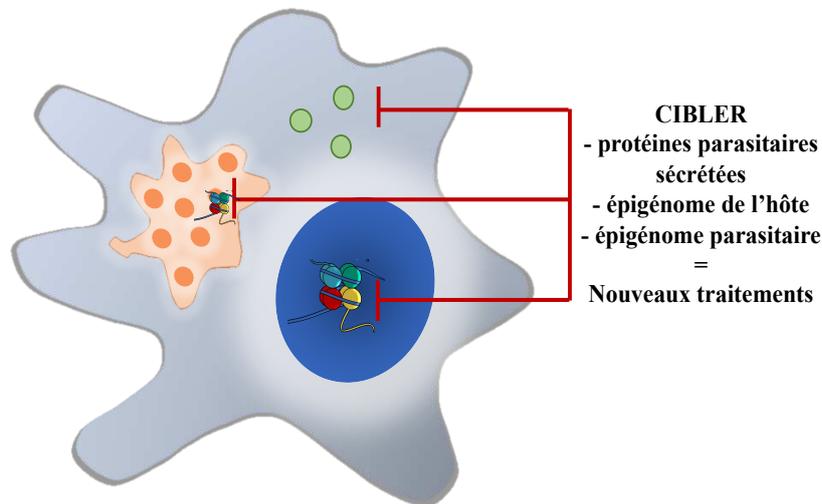


Fig. 11 : Cibler l'interaction hôte-parasite pour découvrir de nouveaux traitements. Les protéines parasitaires libérées dans la cellule hôte modulent son épigénome. Interférer avec ces facteurs parasitaires sur l'épigénome de la cellule hôte, pourra peut-être restaurer un phénotype normal au sein de la cellule hôte et limitera la survie parasitaire.

II-3) b. Inhibiteurs d'enzymes épigénétique au sein de l'infection : focus sur LSD1

Une précédente étude a été faite sur les parasites intracellulaires : *Plasmodium knowlesi*, *Schistosoma mansoni*, *Leishmania amazonensis* et *L. donovani*, sur lesquels ont été testés 4 inhibiteurs d'enzymes épigénétiques ciblant les histones lysines désacétylases. Ces composés sont initialement caractérisés comme 4 molécules anticancéreuses. Ils ont notamment montré des effets prometteurs et inhibiteurs plus particulièrement sur le parasite responsable du paludisme *P. knowlesi*, associés à une hyperacétylation de l'histone H4.⁹¹

LSD1 ou KDM1A est une Lysine Déméthylase qui a un rôle important dans la prolifération cellulaire, la différenciation, et qui est surexprimée dans de nombreux cancers : du sein, du poumon, des ovaires, du colon, des hépatocarcinomes, adénocarcinomes et neuroblastomes... son expression est en corrélation avec les cancers les plus agressifs et de mauvais pronostics. LSD1 est donc une cible prometteuse d'inhibition pharmacologique anticancéreuse.⁹²⁻⁹⁴

Certaines molécules inhibitrices de LSD1 sont déjà utilisées en test clinique contre le cancer.

Cette enzyme est une amine oxydase, dépendante de la flavine adénine dinucléotide (FAD), qui catalyse la mono et di-déméthylation de la marque histone H3K4me2, et, dans des circonstances spécifiques, celle de H3K9.⁹⁵ Plus récemment, il a été montré qu'elle avait un nouveau substrat H4K20⁹⁶, en plus de ses cibles non histones connues comme p53^{97,98}, E2F1⁹⁹ et DNMT1. Ce dernier est déméthylé par LSD1, ce qui le stabilise et verrouille donc les gènes dans un état réprimé dû à l'ADN méthylé. LSD1 fait donc également un lien entre méthylation des histones et méthylation de l'ADN.¹⁰⁰

Les composés étudiés dans cette thèse sont caractérisés comme des dérivés d'un inhibiteur connu de LSD1, appelé TCP.

Ces inhibiteurs de LSD1 sont séparés en 3 groupes :

- les inactivateurs de la MAO-A/B (comme la pargyline, la tranylcypromine (TCP), et la phénelzine) ;
- les inhibiteurs à base de peptide ;
- les inhibiteurs à base de polyamine (SP2509).¹⁰¹

Certains d'entre eux, comme notamment SP2509, inhibent la prolifération des cellules tumorales. De plus, TCP et ce dernier ont tous deux montré un pouvoir inhibiteur sur LSD1, caractérisé par une augmentation du signal de H3K4me2, ce qui favorise l'autophagie dans les cellules de neuroblastome.¹⁰² En effet, LSD1 inhibe l'autophagie en régulant positivement, dans de nombreux cancers, la voie de signalisation de l'autophagie mTOR, elle-même inhibitrice d'autophagie. Récemment, plusieurs études ont découvert que LSD1 était impliqué dans la régulation de l'autophagie par divers mécanismes qui inhibent ce processus. Par exemple, il a été montré que LSD1 se lie au promoteur de la Sestrin2 (SESN2) et réprime son expression. Si LSD1 est inhibé cela va déclencher l'expression de SESN2, qui va bloquer l'activité de mTORC1, libérant le facteur de transcription EB (TFEB) et entraînant sa translocation du cytoplasme au noyau. TFEB va ensuite impacter l'expression des gènes associés à la régulation de la biogénèse lysosomale et donc déclencher l'autophagie.¹⁰³ D'autres études ont également souligné que LSD1 déstabilisait la protéine p62 (aussi appelée Sequestosome, SQSTM1), ce qui inhibait l'autophagie dans les tumeurs gynécologiques. La protéine p62 a un rôle majeur dans l'apoptose, les processus de transformation cellulaire et l'autophagie, elle permet de repérer les substrats à dégrader en se liant aux protéines ubiquitinylées.¹⁰⁴ Dans ce contexte, l'inhibition de LSD1 augmente l'autophagie et l'accumulation de LC3-II mais dégrade p62 et diminue la croissance tumorale.¹⁰⁵

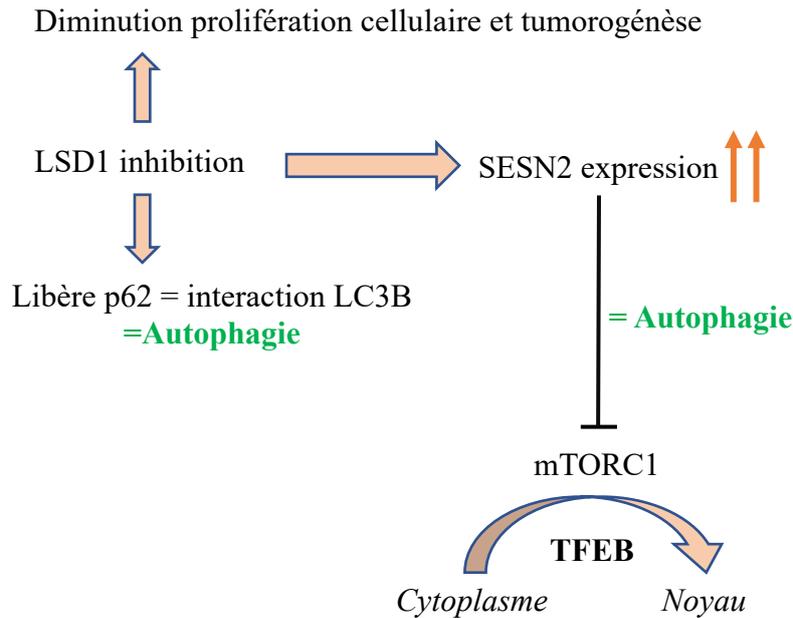


Fig. 12 : Le rôle central de LSD1 dans de nombreux cancers, étant associé à la transformation des cellules. L'inhiber pharmacologiquement ou à l'aide d'un siARN permet de :

- réduire les phénotypes cancéreux,
- stabiliser p62,
- augmenter l'expression de la Sestrin2 qui inhibe la voie mTOR, permet l'induction de l'autophagie et la translocation nucléaire de TFEB pour activer des gènes lysosomaux.

L'autophagie est directement ou indirectement liée à l'épigénétique, que ce soit au niveau de la conformation de la chromatine ou la modification des facteurs de transcription. Son impact direct sur la cancérogénèse est encore en cours de caractérisation. L'enzyme LSD1 inhibe clairement l'autophagie par différents processus, faisant d'elle un candidat intéressant pour la découverte de traitements anticancéreux ciblant épigénétique et autophagie. Nous avons montré au cours de cette partie le rôle majeur de l'épigénétique au cours de l'infection, mais il reste encore à définir l'importance des processus autophagiques au sein de l'interaction hôte-pathogène.¹⁰⁶

III- L'autophagie : un processus complexe mais omniprésent

III- 1) Généralités sur l'autophagie :

III- 1) a. Historique de l'autophagie

Ces dernières années, la notion d'autophagie a connu un grand succès avec de plus en plus de découvertes, de publications, et même un prix Nobel. Ce processus signifiant « se manger soit même » est pourtant connu depuis de nombreuses années, et a été décrit la première fois en 1955. C'est Christian de Duve, qui a reçu le premier Prix Nobel en physiologie et médecine en 1974 sur des organelles associées à l'autophagie. Le terme « autophagie » est alors défini à l'époque comme la dégradation des composants intracellulaires mais aussi l'absorption et dégradation de substances extracellulaires, basé principalement sur des observations morphologiques. Ce n'est qu'en 1993, qu'une étude est réalisée sur la levure par Yoshinori Ohsumi, lui valant le second prix Nobel sur l'autophagie près de 20ans plus tard, en 2016. À la suite d'un criblage génétique, il décrit une quinzaine de gènes impliqués dans l'autophagie : il y en a aujourd'hui une quarantaine, appelés gènes Atg, ayant tous un orthologue chez les mammifères. Depuis, l'autophagie est un sujet en constante croissance avec plus de 60 articles publiés par semaine et a un rôle omniprésent que ce soit au cours d'infections ou de pathologies comme le cancer.¹⁰⁷

III- 1) b. Les mécanismes autophagiques et les différents types d'autophagie

L'autophagie a été dans un premier temps décrite comme un mécanisme de protection activé lorsque les cellules sont en condition de stress (nutritif, oxydatif, dommages à l'ADN, agents pathogènes...) : c'est un mécanisme ayant pour but de redonner de l'énergie à la cellule.

Dans ce processus intracellulaire très conservé, les organites intracellulaires endommagés ainsi que les protéines mal repliées sont capturés dans les autophagosomes en vue d'être dégradés puis recyclés par les lysosomes. L'autophagie pourrait donc se résumer à de la dégradation lysosomale. En plus d'un rôle central dans le métabolisme et le maintien de l'homéostasie cellulaire, l'autophagie a un rôle important lors de la réponse immunitaire, qu'elle soit innée ou adaptative.¹⁰⁶

Par abus de langage, on parle d'autophagie pour faire référence à la macroautophagie où le lysosome a un rôle central.

Il existe divers processus autophagiques et différentes voies associées à l'autophagie. La xénophagie (xeno=les autres), est la forme d'autophagie spécifique à l'élimination de pathogènes intracellulaires.^{108,109} Il a aussi été montré que l'autophagie joue un rôle protecteur dans le vieillissement cellulaire, grâce à l'élimination des mitochondries endommagées, appelée mitophagie.¹¹⁰

Un processus d'autophagie non canonique est la phagocytose associée à LC3 (LAP), pour dégrader des composants phagocytés. Très similaire à la LAP, l'endocytose associée à LC3 (LANDO), dégrade les composants endocytés. Il existe également un processus d'adressage direct de protéines (CMA) à dégrader au lysosome via une interaction avec LAMP2a. Enfin, la microautophagie est décrite comme un phénomène d'incorporation et de dégradation directe de composants cytosoliques.¹¹¹

L'autophagie est décrite en plusieurs étapes avec tout d'abord, la formation de l'autophagosome, une structure à double membrane qui capture les constituants du cytoplasme, puis, suite à sa fusion au lysosome, ces composants seront dégradés.¹¹² Les protéines ATG, décrites par le Pr Ohsumi, permettent la formation de l'autophagosome et sont régulées par divers phénomènes d'ubiquitination.¹¹³

III- 1) c. Les pathologies associées à l'autophagie

L'autophagie est un processus central en cancérologie, à la fois anti et pro-tumoral selon la voie de signalisation qui est activée. Elle pourrait à la fois réduire la prolifération et l'inflammation des cellules tumorales mais également leur fournir assez d'énergie permettant leur survie et division. La résistance à la chimiothérapie pourrait également dépendre de cette dernière.¹¹⁴⁻¹¹⁷ En plus de la signalisation métabolique qui régule l'autophagie, d'autres facteurs comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont impliqués dans ce processus et ont un impact majeur au sein des cellules cancéreuses. Globalement les cellules cancéreuses ont moins d'autophagie que les cellules saines, ce qui est également le cas dans les infections ou les maladies neurodégénératives, mais cette dernière peut être réactivée suite aux divers traitements.^{109,118,119} En effet, lors de l'infection, l'autophagie régule l'inflammation via les voies de réponse immunitaire innée, l'inflammasome. Elle contribue également à la présentation antigénique et à l'homéostasie des lymphocytes T, en vue d'éliminer les micro-organismes.¹⁰⁹

Cette dernière aurait également un rôle contre les maladies neurodégénératives causées par des protéines mal conformées permettant leur dégradation. Enfin, dans les neurones soumis à un fort stress, les cellules vont survivre ou non grâce à l'autophagie et au capteur PARP1.¹²⁰

L'autophagie agit aussi comme un défenseur des mécanismes du vieillissement dans les cardiomyocytes.^{121,122}

III- 1) d. Les voies autophagiques et la formation de l'autophagosome

(i) Deux voies principales pour activer (AMPK) et inhiber (mTOR) l'autophagie

Deux voies de signalisation majeures impliquées dans l'autophagie sont celles de la protéine mTORC1 (mammalian target of rapamycin) qui inhibe la voie de l'autophagie et la protéine AMPK (AMP activated protein kinase) qui l'active. La voie AMPK est activée lorsque l'AMP et/ou l'ADP déplacent l'ATP lié à la sous-unité régulatrice γ , ce qui provoque un changement de conformation et permet la phosphorylation d'AMPK. AMPK lorsqu'elle est phosphorylée au niveau de la Thr172, participe à la formation de l'autophagosome en phosphorylant les protéines liées à l'autophagie dans les complexes mTORC1, ULK1 et Beclin1-PIK3C3 (aussi appelé VPS34). Elle favorise également indirectement l'autophagie en régulant l'expression des gènes associés à des facteurs de transcription tels que FOXO3, TFEB et BRD4.¹¹⁰

Le composé Rapamycine1 a le même effet sur les cellules qu'une privation en nutriments : tous deux inhibent mTORC1 et déclenchent l'autophagie via la libération et activation de ULK1 entraînant l'initiation de l'autophagie. En revanche, si mTORC1 est activé, il inhibe le complexe ULK1 en le phosphorylant sur la Ser757, ainsi que la formation de l'autophagosome. Cette modification perturbe l'action d'AMPK qui vient contre balancer l'activité de mTORC1, en phosphorylant ULK1 au niveau des Sérines 317 et 777, pour favoriser l'autophagie.¹²³ (cf Fig.13) ULK1 phosphoryle à son tour Beclin1 pour initier la formation du phagophore. Cependant, si la protéine Beclin 1 interagit avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2, l'autophagie sera réprimée. Cette interaction doit être réduite pour libérer Beclin1 et lui permettre de jouer son rôle activateur de l'autophagie.

(ii) La phase d'initiation : formation du phagophore

Cette phase dépend de deux complexes ULK et Beclin1-PIK3C3 respectivement composés de ULK1-2/Atg13/FIP200/Atg101¹²⁴ et VPS34/VPS15/Atg14/NBRF2/AMBRA1/BECN1.

Une fois activé, le complexe de ULK1 active le complexe Beclin1-PIK3C3 en phosphorylant Beclin1 sur sa Ser14, ce qui conduit à la production de Phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P). Ce dernier est nécessaire et essentiel pour induire l'autophagie, et pour le recrutement d'autres ATG (notamment ATG9) permettant la formation de la membrane du phagophore.^{123,125,126} Cette membrane peut avoir différentes origines : le réticulum endoplasmique, les mitochondries, ou le Golgi.^{111,127}

(iii) La phase d'élongation du phagophore : formation de l'autophagosome

Cette étape correspond à l'expansion du phagophore et la formation de l'autophagosome. La protéine p62 reconnaît les substrats ubiquitinés à dégrader, et les entraîne dans l'autophagosome via son interaction avec LC3-II. Lorsque l'autophagie est induite, les niveaux de p62 diminuent, comme ce dernier est dégradé.¹²⁸ Atg8 (dans la levure) a 7 homologues dont MAP1LC3B. LC3B existe sous forme cytosolique appelé LC3-I, et doit se conjuguer avec une phosphatidyléthanolamine (PE) pour former l'autophagosome et devenir le marqueur autophagique, LC3-II. Ce dernier s'incorpore à la membrane du pré-autophagosome après son recrutement par le complexe Atg5/Atg12/Atg16L1 qui joue un rôle d'ubiquitine ligase donnant la forme LC3-II et qui se dissocie une fois l'autophagosome fermé. LC3-II se retrouve à la surface interne et externe de l'autophagosome nécessaire pour son expansion, pour la sélection des éléments à dégrader et pour la fusion avec le lysosome.¹²⁹ En parallèle, il y a une augmentation de la synthèse de la protéine LC3, probablement déacétylée dans le noyau puis transloquée dans le cytoplasme.^{130,131}

(iv) La phase de maturation de la formation de l'autophagosome

Une fois l'autophagosome prêt, il fusionne avec le lysosome, formant l'autolysosome et va dégrader les composants ubiquitinés.¹³² Cet événement nécessite la protéine membranaire lysosomal LAMP2 mais aussi des GTPases comme Rab7 ou du complexe SNARE (contenant entre autres la Syntaxin17). De nombreuses hydrolases acides lysosomales permettent la dégradation du contenu de l'autolysosome. Les molécules qui en résultent sont transportées vers le cytosol pour synthétiser des protéines nécessaires à l'homéostasie cellulaire.

Pendant une période de faible apport nutritionnel ou à la suite de traitements activateurs de l'autophagie, il y a une translocation nucléaire du facteur de transcription EB (TFEB), un modulateur principal de l'autophagie et de la biogenèse lysosomale.

Les trois cibles directes de TFEB sont Beclin1, p62 et LAMP1. Dans le cas contraire, TFEB est séquestré et phosphorylé dans le cytoplasme de la cellule par mTORC1.^{133,134}

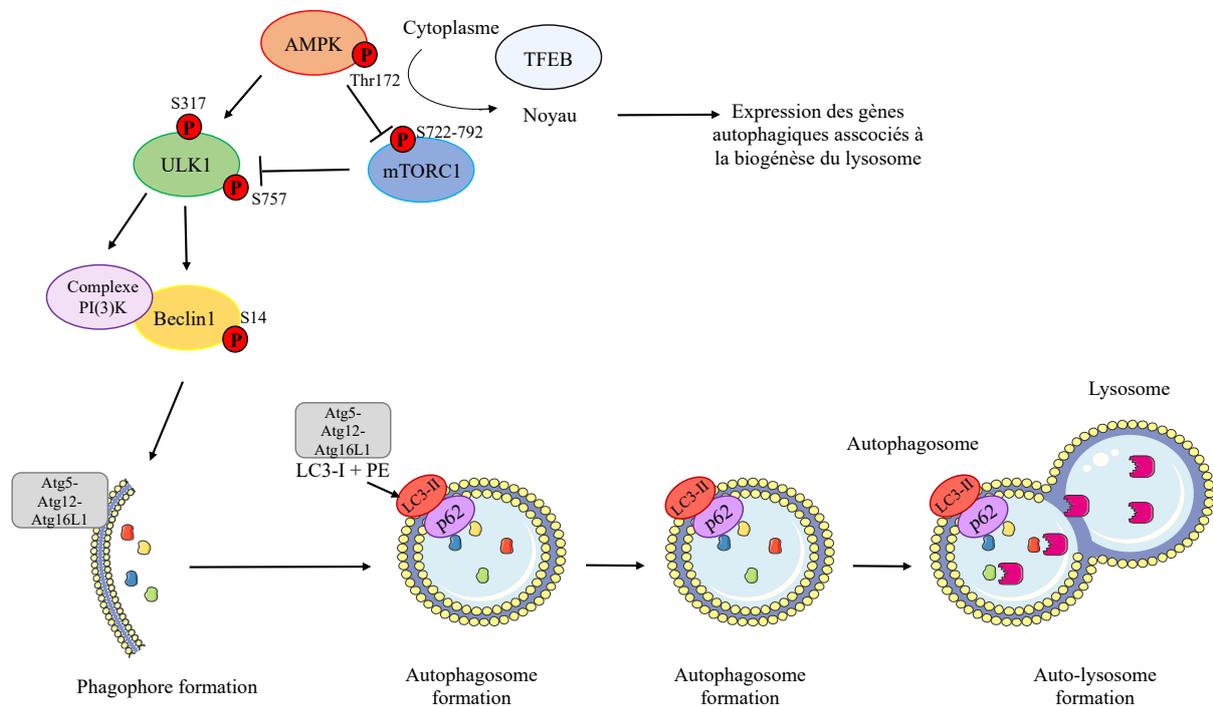


Fig. 13 : Schéma simplifié des processus autophagiques : de la voie activatrice AMPK ou inhibitrice mTOR, à la formation de l'autophagosome puis autolysosome. La phosphorylation de l'AMPK induit une cascade d'événements de phosphorylation conduisant à la formation d'autophagosome. En parallèle, la translocation nucléaire de TFEB induit l'expression de différents gènes impliqués dans l'autophagie et la biogénèse lysosomale. Figure réalisée avec Ivan Ktorza

III- 2) Rôle central de l'autophagie dans l'infection parasitaire

III- 2) a. La dualité de l'autophagie au cours de l'infection

L'élimination des composants cytoplasmiques est le principal rôle de l'autophagie, les agents pathogènes intracellulaires ne devraient donc pas faire exception. De plus, l'autophagie est en lien étroit avec la réponse immunitaire, notamment avec la stimulation des TLR (3 et 4) qui recrutent un adaptateur TRIF afin d'activer la voie NFκB et perturber l'interaction entre Beclin1 et Bcl-2 et donc déclencher l'autophagie.¹³⁵ Les microorganismes ont une immense capacité à évoluer et à s'adapter aux processus de défense mis en place chez l'hôte.

Ils ont donc réussi à échapper à l'autophagie, soit en la détournant à leur profit, soit en l'inhibant, par séquestration de composants essentiels de l'autophagie.

Les infections virales déclenchent un stress cellulaire dont découle l'autophagie, cependant il a été montré que certains virus réutilisent l'autophagie pour leur cycle de vie et leur pathogénicité. Même si l'autophagosome semble être un environnement hostile aux virus, certains s'en servent comme foyer de réplication, leur apportant la protection et l'énergie nécessaires, grâce aux métabolites obtenus par autophagie. Aussi, des études notamment sur des betacoronavirus ont montré que ces virus inhibent le flux autophagique, provoquant l'accumulation d'autophagosomes. Dû à la balance entre autophagie et apoptose, l'hypothèse est que ces molécules entraîneraient une accumulation d'autophagosomes déclenchant des signaux apoptotiques et donc la mort des cellules infectées, empêchant la réplication virale.¹³⁶

Les bactéries intracellulaires sont également capables de survivre dans la cellule hôte en inhibant la maturation autophagosomale. C'est le cas de *Mycobacterium tuberculosis* pour lequel il y a une colocalisation entre les mycobactéries et les autophagosomes, lors de l'activation de l'autophagie ; plus précisément une colocalisation avec LC3-II et Beclin1, deux éléments essentiels des processus autophagiques.¹³⁷ L'autophagie permet donc de dépasser l'inhibition de la maturation phagosomale mise en place par la bactérie et d'entraîner son élimination. *Salmonella Typhimurium* est une bactérie qui se réplique au sein de vacuoles. Certaines vont être endommagées et reconnues par p62, qui va les ubiquitiner, en vue de les dégrader via l'autophagie.¹³⁸

III- 2) b. Les processus autophagiques au sein des Apicomplexes

(i) L'autophagie parasitaire :

Au cours de l'évolution, la majorité des protéines de l'autophagie a été conservée chez les eucaryotes, cependant les parasites Apicomplexes n'en ont gardé que très peu. Le parasite *Toxoplasma* est celui ayant le plus d'orthologues, notamment des protéines d'initiation comme ATG1 et ULK1, mais tous manquent de protéines impliquées dans la nucléation de l'autophagosome ou d'équivalents aux lysosomes.¹³⁹ La machinerie autophagique semble être essentielle chez *Toxoplasma* car une délétion de la protéine TgATG8 (équivalent de LC3) est incompatible avec la survie du parasite.

Aussi, l'absence de TgATG9 a montré une diminution de la virulence, et de la survie parasitaire mais également une moins bonne capacité à supporter le stress cellulaire.¹⁴⁰

De plus, certaines études ont souligné que la vacuole parasitophore (PV) chez *Toxoplasma* et *Plasmodium* pourrait être considérée comme un compartiment de dégradation, et une interface d'échange entre l'hôte et le parasite. Il semblerait que les parasites Apicomplexes et les cellules qu'ils infectent ont une utilisation non canonique de la voie d'autophagie.

(ii) L'autophagie de l'hôte pour éliminer le parasite :

Il a été montré que la réponse immunitaire médiée par l'interféron- γ est essentielle pour la clairance de l'agent pathogène intracellulaire *Toxoplasma* protégé dans sa vacuole. L'hôte va utiliser une voie non classique d'autophagie via l'interféron- γ et la protéine antivirale ISG15 permettant l'ubiquitination de la vacuole en vue de sa dégradation.¹⁴¹

Le parasite *Plasmodium* a développé un mécanisme très spécifique pour échapper à l'autophagie de son hôte. Il a, à la surface de la vacuole parasitophore, une protéine appelée UIS3, qui interagit avec le composant majeur de la formation de l'autophagosome : LC3B. UIS3 entraîne ainsi l'inhibition de l'autophagie, empêchant la protéine LC3B d'interagir avec les composants de la cellule hôte lui permettant de déclencher les processus autophagiques.

De cette manière, *Plasmodium* évite toute séquestration par un phagophore et donc échappe à son élimination. La protéine UIS3 est une cible prometteuse pour le développement de traitements antipaludiques. Aussi, il serait intéressant de caractériser le rôle de cette protéine chez les autres Apicomplexes.^{142,143}

Enfin, nous soulignons également un effet de l'infection en amont de la voie autophagique, au niveau de AMPK : manipuler ce régulateur de l'homéostasie cellulaire est une stratégie très utilisée par les agents pathogènes intracellulaires. Normalement, la voie AMPK est induite lors de l'infection due aux besoins énergétiques des agents pathogènes, cependant, chez *Plasmodium*, elle semble être inhibée et sa surexpression entraîne d'ailleurs la mort du parasite. La voie AMPK ayant un rôle central dans l'autophagie, cela démontre l'intérêt de ce processus en tant que suppresseur de l'agent pathogène, et fait de AMPK une cible thérapeutique à considérer.¹⁴⁴

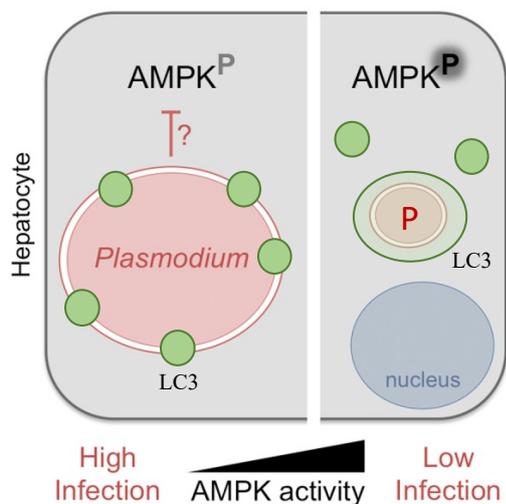


Fig. 14 : Schéma représentant l'inhibition de la voie AMPK chez *Plasmodium* corrélée avec une importante infection, et inversement la phosphorylation de AMPK, permet l'activation de l'autophagie et la diminution de la charge parasitaire. L'activité d'AMPK est anti corrélée au niveau d'infection.

La protéine LC3B représentée en vert, est séquestrée au niveau de la vacuole parasitaire, mais dégradée dans l'autolysosome quand l'autophagie est réactivée.

Figure adaptée de l'article « Host AMPK Is a Modulator of Plasmodium Liver Infection » de Margarida T. Grilo Ruivo

(iii) L'autophagie chez *T. annulata* :

Ce parasite, contrairement aux autres membres des Apicomplexes, n'a pas de PV ; il est totalement exposé au cytoplasme des leucocytes qu'il infecte, et sa survie dans ces conditions montre qu'il n'est pas ciblé et dégradé par l'autophagie de la cellule hôte.

Nous ne savons toujours pas précisément comment *T. annulata* échappe à la machinerie autophagique de l'hôte mais le dogme serait que comme *Plasmodium*, il serait capable d'inhiber les voies autophagiques de l'hôte. Le statut autophagique des cellules infectées par *T. annulata*, n'a quasiment pas été étudié. Une revue de Latré de Laté. P en 2017 ¹³⁹, a relevé certaines hypothèses basées sur des données non publiées :

- la séquestration de LC3B au parasite pour se protéger de l'autophagie ; après un traitement anti parasitaire, *T. annulata* serait entouré de LC3B (supposé autophagosome ou autolysosome) ;
- l'augmentation de JNK2 au cours de l'infection, contribuerait aux niveaux élevés et stables observés de p62 reflétant un blocage de l'autophagie : son inhibition entraîne la dégradation lysosomale de p62 (même effet avec anti parasitaire) ;
- une potentielle phosphorylation de LC3B médiée par l'AMPc-PKA, pour contribuer à l'infection et bloquer l'autophagie.

La compréhension des processus autophagiques chez *T. annulata* pourrait se révéler essentielle pour étudier à la fois l'aspect cancérologique et parasitologique de ce modèle. L'avenir est à la recherche de petites molécules/nanoparticules ciblant l'autophagie pour combattre l'infection.

Objectifs

Au laboratoire, nous travaillons majoritairement sur le stade macroschizonte du cycle de vie parasitaire et sur 3 types cellulaires différents. En effet, nous utilisons des macrophages infectés par *Theileria annulata*, appelés Tac12, dont le syncicium peut être marqué ou non en GFP grâce à la fusion entre une protéine GFP et une protéine hôte Clasp1, séquestrée au parasite. Nous utilisons également des lignées lymphocytaires B, infectées, appelées TBL3 et non infectées, BL3. Cela nous permet de déterminer l'effet de l'infection sur l'hôte en comparant directement ces deux lignées cellulaires identiques. Enfin, nous confirmons parfois nos résultats sur un autre genre du parasite *Theileria* : *Theileria parva*, dont les Lymphocytes T infectés s'appellent Tpm.

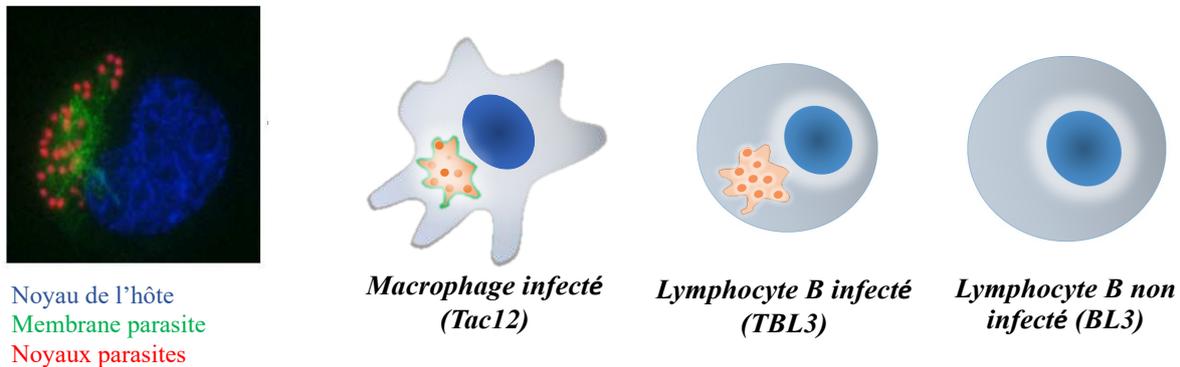


Fig. 15 : Types cellulaires utilisés au laboratoire, infectés ou non par *Theileria*. À gauche image d'immunofluorescence représentant un macrophage Tac12 infecté par *T. annulata* au stade macroschizonte.

Mon travail de thèse s'est déroulé autour de 3 axes visant à mieux comprendre les interactions entre le parasite *Theileria annulata* et son hôte bovin. Le fil conducteur de ces études a été l'utilisation de la « chimie génétique » : ces petites molécules nous ont permis d'en apprendre davantage sur les interactions hôte-pathogène, dans un modèle où toute modification génétique est impossible.

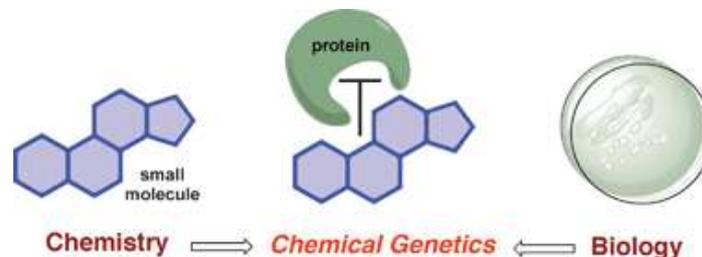


Fig. 16 : Schéma représentant le concept de la Chimie génétique, associant chimie et biologie. Cela permet d'inhiber certaines protéines à l'aide de petites molécules. Figure extraite de l'article « Chemical genetics » de Cornelius J. O' Connor.

Cette étude a permis :

- la caractérisation de l'**épigénome parasite** à travers une marque histone spécifique à *T. annulata*, H3K18me1 ;
- la découverte de **deux nouveaux traitements** contre la theileriose grâce à un criblage microscopique de petites molécules : l'un provenant d'une librairie de composés déjà connus dans **d'autres infections** ; et l'autre appartenant à une librairie **d'inhibiteurs d'enzymes épigénétiques**.
- la description du mode de fonctionnement de ce composé prometteur qui semble **éliminer le parasite**, sans impacter la cellule hôte et inverser le **phénotype cancéreux**. Nous avons donc étudié le processus cellulaire de l'autophagie, potentiellement inhibé dans les cellules infectées et réactivé suite au traitement.

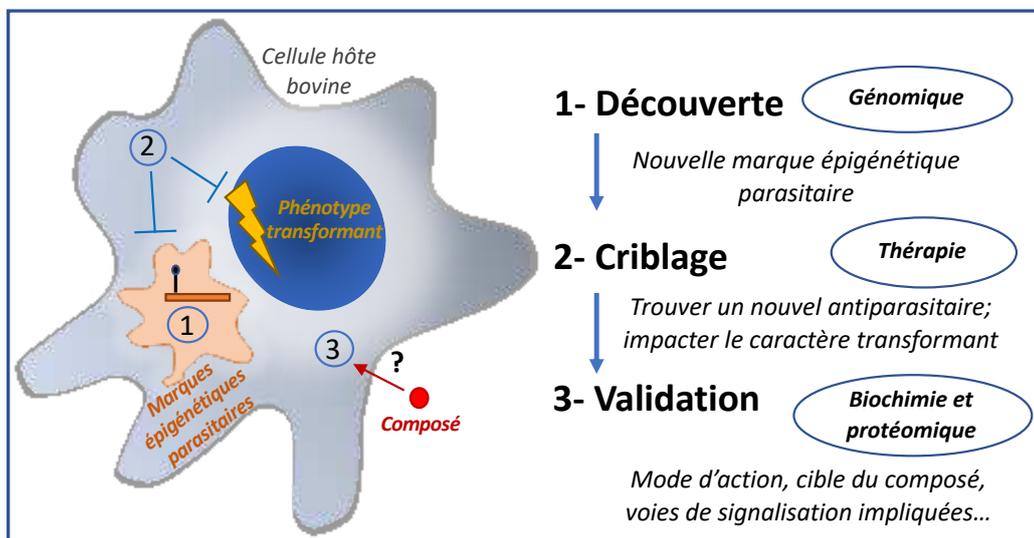


Fig. 17 : Schéma récapitulatif du projet de thèse.

Ces recherches ont permis la parution d'une revue : "The clever strategies used by intracellular parasites to hijack host gene expression" dans le journal « *Seminars in Immunopathology* »⁷⁴ ; et d'un article : « *Dynamic methylation of histone H3K18 in differentiating Theileria parasite* » dans le journal « *Nature communications* »⁷⁹. Un second article: « *Trifloxystrobin blocks the growth and differentiation of Theileria parasites independently of the TaPin1 effector* » est cours de révisions chez « *Communication Biology* ». La caractérisation phénotypique et le mode d'action du composé caractérisé comme un inhibiteur d'enzyme épigénétique, ainsi que son effet sur l'autophagie au sein des cellules infectées, feront l'objet d'une dernière publication.

Matériel
et
Méthodes

Les principales expériences réalisées au laboratoire sont répertoriées et décrites dans la section « Materials and methods » des articles de la partie Résultats I et II.

Le matériel et méthodes ci-après correspondent aux expériences qui ne sont pas encore publiées.

Traitements des cellules infectées par *T. annulata* :

- La Buparvaquone a été utilisée à 50 ng/ml pendant 24 ou 48 heures ;
- Le composé MC2646 a été utilisé à 1µM pendant 48h heures ou 4µM pendant 24 heures ;
- L'activateur de l'AMPK (991) a été utilisé à 4µM pendant 24h ;
- L'inhibiteur de l'hypusination, GC7, a été utilisé à 10µM pendant 24h ;
- La Spermidine a été testée à 100µM pendant 24h.
- La Chloroquine (CQ) / la Torin1 à 1µM pendant 24 heures
- La Bafilomycine A1 (BafA1) 1µM pendant 24 heures ou 50nM, 3H

Extraction des protéines et western blot :

Durant 24h avant l'extraction, 500 000 cellules sont cultivées dans des plaques 12 puits. Les protéines sont extraites avec du tampon de lyse Laemli, puis résolues par des gels de migration SDS-PAGE 4-12%, et transférées sur des membranes de nitrocellulose, avant d'être incubées pendant une nuit à 4°C avec des anticorps primaires (de souris ou de lapin) contre eIF5A (1/40000), eIF5A-hypusiné (1/4000), AMPK (1/2000), pAMPK (1/2000), LC3B (1/2000), LSD1 (1/1000) et Actine (1/10000), suivis d'anticorps secondaires produits contre des anticorps de souris ou de lapin. L'anticorps AMPK phosphorylé a été dilué dans du TBST et les cellules ont été traitées avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases.

Immunofluorescence et microscopie : Les cellules B (BL3 & TBL3) ont été lavées avec du PBS et 3.10⁴ cellules par lame ont été centrifugées avec la Cytospin (10 min à 1000×g) pour adhérer à la lame. Les cellules ont été fixées dans du paraformaldéhyde à 3,7 % pendant 10 minutes, ou avec du Méthanol 100% froid pendant 5min ; puis perméabilisées dans du PBS-Triton à 0,2 % pendant 10 minutes. Les cellules ont été bloquées avec du PBS 0,2% Tween (PBST)-1% BSA pendant 30 minutes. Les anticorps primaires ont été dilués dans du PBST et incubés pendant 1 heure aux dilutions suivantes : 1/200 (eIF5A) ; 1/300 (TFEB) ; 1/500 (p62) ; 1/250 (LC3B) ; 1/200 (Complement C3a). Les cellules ont été lavées trois fois avec du PBST et incubées avec un anticorps secondaire pendant 30 minutes à une dilution de 1/1000.

Les cellules ont été lavées trois fois avec de la PBST et enfin, montées sur des lamelles en ajoutant du milieu de montage contenant du DAPI. Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un microscope à épifluorescence Leica DMI 6000. Les images ont été générées et traitées à l'aide des logiciels Metamorph et ImageJ. Les expériences de comptage des parasites ont été réalisées avec un minimum de n=30 cellules.

Néon-transfection : Nous avons besoin de 500000 cellules par puit (plaque de 24 puits), il faut d'abord les rincer avec du PBS, puis centrifuger 5 minutes à 900 rpm, et ajouter 10uL de Buffer R sur le culot cellulaire, provenant du kit de Neon-transfection. Ensuite 1,5µL de siARN à 20µM (soit 400nM) ou 0,5µg d'ADN (plasmide) sont ajoutés au culot de cellules. Du Buffer E est mis dans un tube électrolytique et inséré dans la machine. Les conditions d'impulsion électrique pour des lymphocytes infectés sont de 1200V/40ms/ 1 impulsion. Plasmide LC3-gfp fourni par Benoit Violet et Plasmide LC3-rfp-gfp fourni par Lucile Espert.

« Click chemistry » : Afin d'identifier la cible du MC2646, nous avons utilisé un composé dérivé qui se prête à la réaction de « Click ». Le MC2646 couplé à une alkyne, donne le composé MC4404. L'azide peut être est couplée avec un AlexaFluor-488 ou 594nm, ou à une Biotine. Nous traitons les cellules de 30 minutes à 1 heure avec 1µM de MC4404. Après fixation PFA des cellules sur lames, perméabilisation et blocage (cf protocole immunofluorescence), nous réalisons la « réaction de click ». Les tampons de réaction utilisés proviennent du kit d'imagerie « Click-IT Plus EdU Alexa fluor 594 Imaging kit », de chez Invitrogen, composé de deux tampons de réaction, de cuivre et d'AlexaFluor594-Azide. Le Cuivre permet de lier le composé avec le fluorescent ou la biotine. Nous sommes ensuite en mesure de visualiser la localisation de la molécule et sa cible dans la cellule, après des lavages et un montage avec un milieu contenant du DAPI.

Un second composé « clickable et photocrosslinkable » permettant une reconnaissance de la cible et une interaction solide, après exposition aux UV (300nm, 2min d'exposition), entre la cible et le composé, a été utilisé, il s'appelle MC4564. Dans ce cas, nous avons traité les cellules avec 10µM de MC4564, 30 minutes à 1 heure, puis nous avons réalisé un « crosslink » UV, extrait les protéines avec du tampon Ripa, puis nous avons incubé les protéines avec le mix de click où l'alkyne est combinée à une Biotine et à un fluorescent (TAMRA biotin-Azide, de chez Click chemistry tools). L'extrait protéique et le composé biotinylé, suite à la réaction de click, sont ensuite incubés toute la nuit avec des billes aimantées associées à de la Streptavidine, permettant l'interaction biotine-streptavidine.

Après 3 lavages au tampon Ripa et 3 lavages à l'eau, une partie des billes est reprise dans du tampon Laemli pour visualiser par fluorescence les protéines cibles sur gel. L'autre moitié est reprise dans de l'eau en vue d'une expérience de Spectrométrie de Masse.

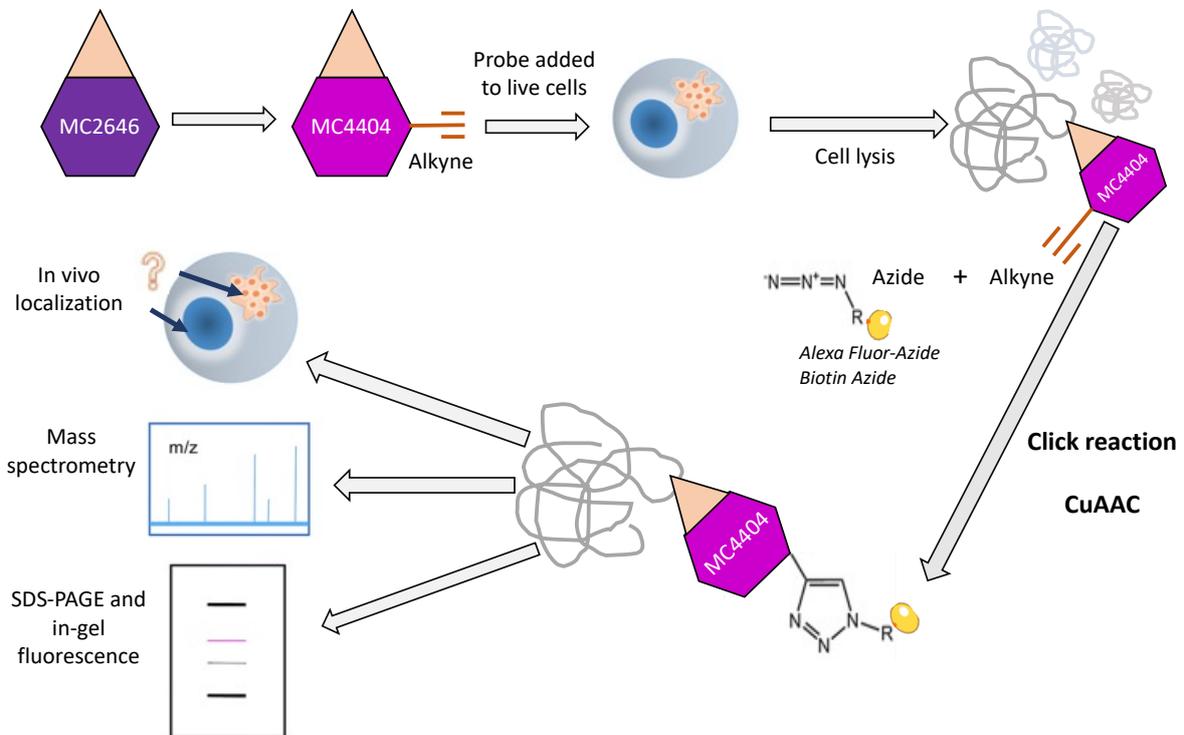


Fig. 18 : Schéma de la réaction de « click chemistry » avec le dérivé « clickable » de MC2646 : MC4404 pour déterminer la localisation de la cible du composé. L'alkyne et l'azide après une réaction avec du Cuivre se lient pour former un triazole. L'azide est liée à un marqueur fluorescent permettant d'observer l'emplacement de la cible ou liée à de la biotine, pour ensuite réaliser un pull down du composé et de sa cible avec des billes aimantées associées à de la Streptavidine puis de la spectrométrie de masse afin de caractériser cette cible.

Les figures et les statistiques ont été créées à l'aide de Graphpad Prism 9. (Voir les statistiques sous les figures)

Résultats

I- Identification et caractérisation d'une nouvelle marque épigénétique importante pour le cycle de vie parasitaire chez *T. annulata* : H3K18me1

I- 1) Introduction

L'étude du parasite intracellulaire bovin *T. annulata*, soulève un grand nombre de questions sur le rôle de l'épigénétique lors de l'infection et les mécanismes de transformation associés. *T. annulata* est un maître dans la manipulation de son hôte : il détourne de nombreux et importants processus cellulaires de l'hôte à son avantage. Il rend la cellule infectée cancéreuse, et ce, sans modifier le génome bovin, laissant penser que divers processus épigénétiques sont impliqués. L'étude de l'épigénétique des interactions hôte-parasite offre une opportunité inédite d'explorer les échanges entre deux épigénomes eucaryotes, ainsi que leur contribution à chacun des phénotypes.

Les parasites membres de la famille Apicomplexes, sont capables d'entraîner des changements stables et durables de l'épigénome de l'hôte.⁵⁴ Le rôle des mécanismes épigénétiques et des modifications post-traductionnelles des histones dans la régulation de l'expression des gènes sont très bien établis pour un grand nombre d'organismes modèles⁸¹. Cependant, peu de choses sont connues sur la façon dont les génomes parasites sont régulés et les mécanismes épigénétiques contrôlant leur différenciation. Ces derniers pourraient réellement jouer un rôle majeur dans la régulation de l'expression génique dû à la rareté des facteurs de transcription dans les génomes des Apicomplexes. L'étude des mécanismes épigénétiques au sein des cellules infectées et notamment dans la famille des Apicomplexes, ouvre donc de nombreux horizons sur les mécanismes permettant la régulation génique lors de l'infection. Les histones méthyltransférases (KMT) et les histones déméthylases (KDM) sont des espèces enzymatiques hautement conservées. A la différence des autres membres de la famille des Apicomplexes, il existe peu d'informations chez *T. annulata*, concernant le remodelage de la chromatine et les modifications des histones.

En effet, chez *Plasmodium falciparum* ou *Toxoplasma gondii*, plusieurs enzymes à domaines SET ayant montré des activités méthyltransférases ont déjà été caractérisées.

Différentes marques histones ont également été décrites, notamment la méthylation de H4K31, commune aux deux parasites.⁸⁵ Récemment, une nouvelle « lysine méthyltransférase apicale » (AKMT) n'ayant pas de cible histone et avec une structure proche de celle des protéines SMYD, a été découverte comme impliquée dans la motilité de *Toxoplasma gondii*.⁸⁶

Theileria annulata compte, lui, au moins 5 KMT à domaines SET et 2 KDM caractérisés comme ayant des domaines Jumonji (Supp figure S10). Cependant, contrairement aux autres Apicomplexes, aucune marque épigénétique n'a été décrite chez *Theileria*, et aucune étude n'a été faite sur ces enzymes.

Au laboratoire, nous nous sommes intéressés aux marques histones spécifiques au parasite et aux enzymes parasitaires responsables de ces modifications post traductionnelles. Un criblage d'anticorps a été réalisé, afin de caractériser la localisation hôte ou parasitaire d'un panel de marques histones. Seule la marque H3K18me1 a été montrée comme spécifique au parasite dans les lymphocytes B infectés (TBL3) et les macrophages infectés (Tac12) de *T. parva* et *T. annulata*. En effet, elle est quasi inexistante dans les lymphocytes B non infectés BL3, et diminue après traitement Buparvaquone, c'est-à-dire, après réduction de la charge parasitaire. Ces résultats suggèrent que la méthylation de H3K18 est un marqueur général des noyaux des schizontes de *Theileria*.

Parmi les 5 KMT de *Theileria*, l'une d'entre elles, TaSETup1, ressemblant fortement à la protéine SMYD3 (cf Fig.6b de l'article), a été montrée comme capable de monométyler la lysine 18 de l'histone H3. Après séquençage du génome bovin et parasitaire, combiné à des analyses de « Chip-seq », nous avons pu observer que cette marque était enrichie dans le parasite, mais plus précisément au niveau du corps des gènes réprimés au stade macroschizonte. A l'étape suivante du cycle parasitaire, la mérogonie, la présence de H3K18me1 diminue dans certains noyaux parasitaires. Étant dans l'impossibilité de faire des modifications génétiques chez *Theileria*, nous avons fait le choix d'utiliser des inhibiteurs d'acétylation ou de méthylation afin d'impacter le niveau d'H3K18me1. Cela nous a permis de montrer que H3K18me1 avait un rôle essentiel dans la différenciation parasitaire, régulant l'expression de gènes spécifiques à certaines étapes de son cycle de vie. Nous rapportons donc la première caractérisation d'une marque épigénétique sur les queues d'histones parasitaires chez le parasite *Theileria annulata*.

I- 2) Publication :



ARTICLE



<https://doi.org/10.1038/s41467-021-23477-2>

OPEN

Dynamic methylation of histone H3K18 in differentiating *Theileria* parasites

Kevin Cheeseman^{1,4}, Guillaume Jannot^{1,4}, Nelly Lourenço^{1,4}, Marie Villares^{1,4}, Jérémy Berthelet^{1,2}, Teresa Calegari-Silva¹, Juliette Hamroune³, Franck Letourneur³, Fernando Rodrigues-Lima² & Jonathan B. Weitzman¹✉

Lysine methylation on histone tails impacts genome regulation and cell fate determination in many developmental processes. Apicomplexa intracellular parasites cause major diseases and they have developed complex life cycles with fine-tuned differentiation events. Yet, apicomplexa genomes have few transcription factors and little is known about their epigenetic control systems. Tick-borne *Theileria* apicomplexa species have relatively small, compact genomes and a remarkable ability to transform leucocytes in their bovine hosts. Here we report enriched H3 lysine 18 monomethylation (H3K18me1) on the gene bodies of repressed genes in *Theileria* macroschizonts. Differentiation to merozoites (merogony) leads to decreased H3K18me1 in parasite nuclei. Pharmacological manipulation of H3K18 acetylation or methylation impacted parasite differentiation and expression of stage-specific genes. Finally, we identify a parasite SET-domain methyltransferase (TaSETup1) that can methylate H3K18 and represses gene expression. Thus, H3K18me1 emerges as an important epigenetic mark which controls gene expression and stage differentiation in *Theileria* parasites.

¹ Université de Paris, Epigenetics and Cell Fate, CNRS, Paris, France. ² Université de Paris, Functional and Adaptive Biology, CNRS, Paris, France. ³ Université de Paris, Institut Cochin, Inserm, CNRS, Paris, France. ⁴ These authors contributed equally: Kevin Cheeseman, Guillaume Jannot, Nelly Lourenço, Marie Villares. ✉email: jonathan.weitzman@u-paris.fr

Our ability to control infectious diseases is improved by our understanding of their complex life cycles and the characterization of pathogen-specific mechanisms that can be targeted by drug strategies. Apicomplexa parasites are a major cause of disease in humans and domesticated animals across the world. For example, *Plasmodium* species cause malaria affecting millions of people each year, emphasizing the need for effective drugs targeting parasites^{1,2}. *Cryptosporidium* is a major cause of diarrhoea in developing countries following infection from contaminated water supplies and there is currently no effective drug therapy^{3,4}. *Theileria* species are bovine-specific pathogens that cause diseases with significant economic impact; Tropical Theileriosis kills over a million cattle per year and costs in the hundreds of millions of dollars. The development of new therapeutic strategies is challenging, as Apicomplexa are eukaryotic cells and share many metabolic pathways with their host animals².

Of all the apicomplexa parasites, *Theileria* is the only eukaryote known to transform its host cell and constitutes a unique model system to explore parasite–host interactions and microbial tumorigenesis^{5,6}. Two *Theileria* species, *T. parva* and *T. annulata* are bovine-specific pathogens that cause severe disease following tick transmission. Infection by these *Theileria* species causes a lymphoproliferative disease in cows with clinical features similar to some human leukaemias^{5,7,8}. *T. annulata* infects mainly bovine B cells and macrophages, whereas *T. parva* infects bovine B and T lymphocytes. *Theileria*-infected cells are transformed and immortalized; they display uncontrolled proliferation in vitro, independent of exogenous growth factors, and increased ability to migrate and form metastases in immunodeficient mice. Interestingly, *Theileria*-dependent transformation is reversible; animals treated with the theilericidal drug Buparvaquone are cured in most cases. When *Theileria*-infected cells are treated in vitro with Buparvaquone, the intracellular parasite diminishes in the host leucocytes, which lose the transformed phenotype, but drug resistance in the field is an emerging concern for disease control. To achieve transformation, the parasite manipulates the host cell signalling pathways that control cell proliferation and survival^{5,6,8}. Several host signaling pathways have been implicated in *Theileria*-induced transformation including metabolic pathways^{9,10}, c-Jun N-terminal Kinase (JNK) signaling¹¹ and host nuclear factors, such as c-Myc, E2F and AP-1^{12–15}. A parasite secreted factor, TaPin1, activates host signaling pathways leading to activation of oncogenic host c-Jun and metabolic gene expression^{16–18}. While previous studies have focused on the host signaling pathways activated by intracellular parasites^{6,15}, very little is known about the regulation of the parasite genome and the mechanisms that orchestrate parasite differentiation and its complex life cycle. A previous study monitored gene expression through merogony, the process of parasite differentiation from intracellular schizonts to infectious merozoites, and reported interesting changes in the levels of transcription factors of the AP2 family¹⁹. However, the relative paucity of transcription factors in *Theileria* genomes²⁰ suggests that other mechanisms such as epigenetic pathways may also contribute to parasite differentiation.

Many diseases, especially cancer, are linked to epigenetic events that lead to changes in gene expression. Epigenetic changes associated with disease states include DNA methylation and histone modifications such as lysine methylation and acetylation^{21,22}. Epigenetic enzymes have been causally linked to many diseases making them promising targets for drug interventions²³. Recently novel drugs that inhibit methylation or deacetylation were developed and some obtained FDA approval to treat cancer. Notably, lysine methylation is emerging as a versatile and dynamic post-translational modification (PTMs) that contributes critically

to cellular differentiation programmes²⁴. The human genome encodes about 50 biochemically validated lysine methyltransferases (KMTs) that ‘write’ the methylation code and 20 lysine demethylases (KDMs) that act as ‘erasers’. Numerous reports of misregulation of KMTs and KDMs in cancer drove an intense search for specific small-molecular inhibitors²¹. Despite these advances, relatively little is known about the role of epigenetic proteins (methylation Writers or Erasers) in infectious diseases or in infection-induced cancers^{25,26}. The posttranslational modification of lysine residues in the histone N-terminal tails plays an important role in regulating chromatin structure and gene expression in all eukaryotes²², but has not been previously studied in *Theileria* parasites. We hypothesized that epigenetic modifications, particularly lysine methylation of histone tails, could be a feature of parasite differentiation and that the characterization of parasite encoded epigenetic enzymes could be future drug targets for anti-parasite therapies. In this work we describe the role of methylation of histone H3K18 as an important gene regulatory event during the differentiation of *Theileria* parasites and identify the first parasite methyltransferase capable of methylating H3K18.

Results

Parasite histones are methylated at H3K18. To initiate a study of epigenetic regulation in *Theileria* parasites, we examined parasite histones focusing on H3. Our analysis of the *T. annulata* genome revealed the presence of two genes encoding histone H3 (Supplementary Fig. 1). The sequences of the N-terminal tails, especially the Lysine residues, are particularly well-conserved in the H3 proteins from *T. annulata*, *T. parva* and mammals (Supplementary Fig. 1). We, therefore, examined histone modifications using a panel of commercial antibodies recognizing different modified lysine residues in H3 tails. Many of the antibodies we tested by immunofluorescence staining showed strong signals in both host and parasite nuclei; these included relatively well-studied marks such as H3K4me3 and H3K36me3 (see below). However, one modification caught our attention: antibodies recognizing mono-methylated H3K18 (H3K18me1) detected *T. annulata* parasite nuclei, but did not stain bovine host nuclei (Fig. 1a, b). We conducted a series of experiments to pursue the specificity of this initial observation. In contrast to H3K18me1, antibodies against acetylated H3K18 (H3K18ac) displayed strong immunofluorescence signals in both host and parasite nuclei in infected and non-infected bovine B cells (Fig. 1a, b). We observed similar parasite-specific staining for H3K18me1, but not for H3K18Ac, in *T. annulata*-infected macrophages TaC12 (Fig. 1c, d) and in lymphocytes infected with related *T. parva* parasites (Supplementary Fig. 2). Further control experiments with three independent antibodies demonstrated the specificity of the antibody for mono-methylated H3K18 residues, with no cross-reaction to other well-studied H3 lysine methylations (Supplementary Fig. 3). Notably, the sequence around the H3K18 residue is extremely similar in parasite or bovine histones (Supplementary Fig. 1). The difference in monoisotopic mass between the Serine-22 and Threonine-22 residues is virtually the same as a methyl group (14.01565): so mass spectrometry could not be used effectively to distinguish between parasite and bovine H3K18 modifications. We confirmed the presence of methylated and acetylated H3K18 in TBL3, TpMD409 and TaC12²⁷ parasite-infected cells by immunoblot experiments (Fig. 1e, f and Supplementary Fig. 2b).

Treatment with the theilericidal drug Buparvaquone (Bup), which kills the parasites, reduced H3K18me1 levels in cell lines infected with *T. annulata* or *T. parva* (Fig. 1e, f and Supplementary Fig. 2b). From these experiments, and careful controls, we conclude

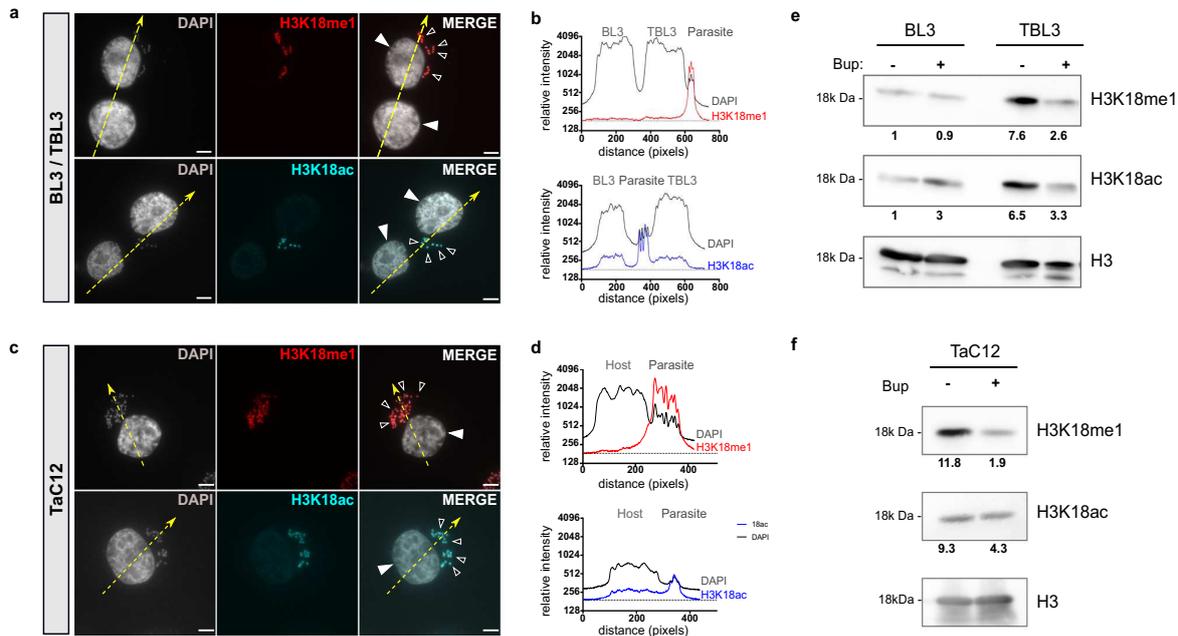
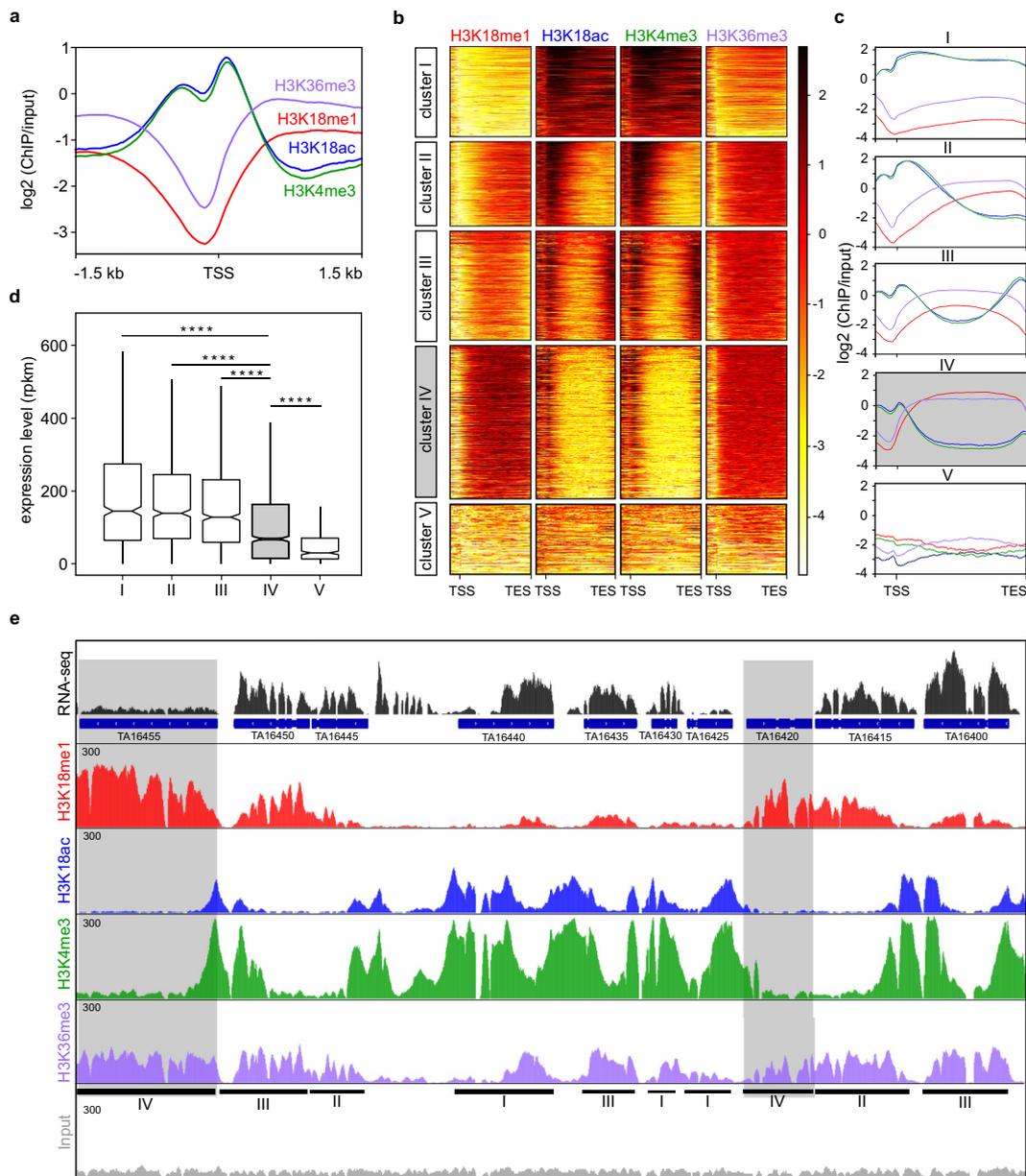


Fig. 1 H3K18 methylation marks parasite nuclei. **a** Immunofluorescence analysis of BL3 (uninfected) mixed with TBL3 (infected) cells. Host and parasite nuclei are stained with DAPI (grey). Histone marks were detected with specific antibodies for H3K18me1 (red) or H3K18ac (cyan). Solid white arrowheads indicate the nuclei of the bovine cells and the smaller empty arrowheads point to parasite nuclei in TBL3 cells only. The yellow dotted arrows indicate the cross-section planes used for quantification. Scale bar = 5 μ m. **b** Quantification of immunofluorescence intensity of H3K18me1 (red) and H3K18ac (blue) compared to DNA/DAPI (grey). The plot profiles are representative of the yellow cross-section lines. **c** Immunofluorescence staining for H3K18me1 (red) and H3K18ac (cyan) in parasite-infected macrophages (TaC12 cells). Host and parasite nuclei are stained with DAPI (grey). Leica microscope, $\times 100$. Scale bar = 5 μ m. Solid white arrowheads show the bovine host nuclei and empty arrowheads point to parasitic nuclei. The yellow dotted arrows indicate the cross-section planes used for quantification. **d** Quantification of immunofluorescence intensity of H3K18me1 (red) and H3K18ac (blue) compared to DNA (grey). The plot profiles are representative of the yellow cross-section lines. **e** Western blot analysis of BL3 and TBL3 cells (treated with the theilericidal drug Buparvaquone, Bup). H3 was used as a loading control. The bands were quantified and compared with uninfected BL3 cells. Results are representative of at least three independent experiments. **f** Western blot analysis of H3K18 modifications in infected TaC12 macrophages treated with or without Buparvaquone (Bup). The bands were quantified and compared with uninfected BL3 cells. Results are representative of at least three independent experiments. All these experiments were performed three times independently with similar results; representative experiments are shown. Full scans blot and immunofluorescence replicates are included in the Source Data file.

that H3K18 mono-methylation appears to be a feature of *Theileria* parasite schizonts.

H3K18me1 is enriched on the gene bodies of repressed genes in *Theileria* schizonts. Acetylation of H3K18 is a well-studied epigenetic mark linked to gene activation²⁸, whereas no studies have focused on the functional role of H3K18 methylation in gene regulation. Indeed, no specific gene regulatory functions have been ascribed to H3K18me1. To investigate H3K18 modifications on the *Theileria* genome, we performed chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-Seq, performed in duplicates, which we subsequently merged upon good replicate correlations, see Supplementary Fig. 5, to generate the figures shown here) with several antibodies and parallel RNASeq transcriptome analysis. Our dual-sequencing in infected TBL3 cells, followed by reading mapping and bioinformatics analysis, allowed us to simultaneously map epigenomic features on both the parasite and the bovine host genomes. Our analysis of the parasite epigenome revealed some patterns previously described on mammalian genomes; namely, promoter regions around the transcriptional start site (TSS) were enriched for ‘activating’ epigenetic marks such as H3K4me3 or H3K18ac in the parasite genome (Fig. 2a). In contrast, H3K18me1 levels were lowest at the TSS and enriched on the gene bodies (Fig. 2a). Analysis of the

bovine genome in the same ChIP-Seq experiments showed enrichment for H3K4me3 and H3K18ac on promoter regions, but no H3K18me1 enrichment on gene bodies, consistent with the parasite-specific immunofluorescence staining results (Supplementary Fig. 4a, b). Gene-body enrichment on actively transcribed genes is a feature of H3K36me3 methylation in mammals²⁹. We observed gene-body enrichment for H3K36me3 on genes in the parasite genome (Fig. 2e and Supplementary Fig. 4c). We observed a strong correlation between gene promoter H3K4me3 and H3K18ac, and a weaker correlation between H3K18me1 and H3K36me3 in the parasite genome (Supplementary Fig. 5a–c). The H3K18me1 and H3K36me3 profiles are, however, quite distinct; a differential peak-calling approach on these two modifications revealed differences in the number of peaks (1537 for H3K18me1, 3122 for H3K36me3). We performed k-means clustering analysis of the H3K18me1 profiles on the *T. annulata* parasite genome and defined five clusters (Fig. 2b). Cluster I and Cluster V had the lowest levels of H3K18me1, whereas Cluster IV genes (1103 genes) were enriched for gene-body H3K18me1 (Fig. 2c). In contrast, H3K36me3 levels were relatively high across all clusters, except Cluster V. Comparison with our RNA-Seq data revealed that Cluster IV genes were characterized by lower gene expression compared to Clusters I–III (Fig. 2d, e). Notably, Cluster IV genes were particularly enriched for gene-body H3K18me1 which appeared mutually



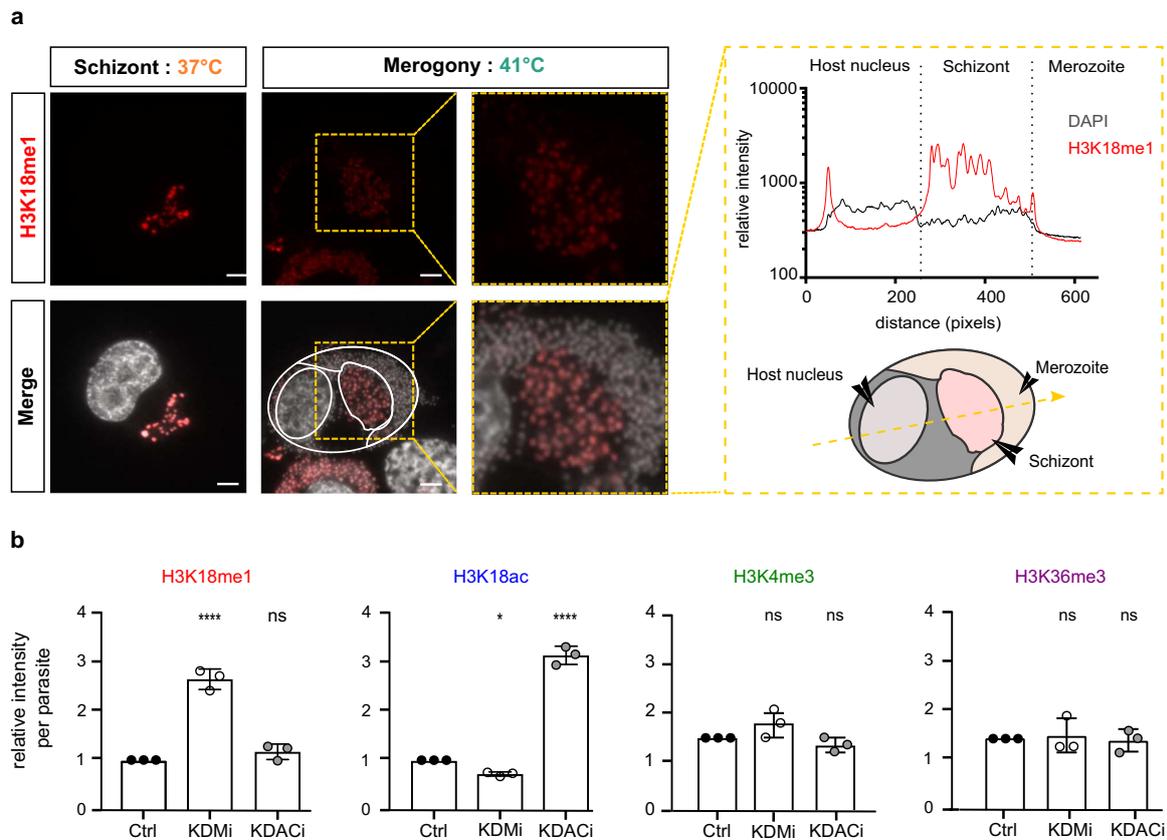
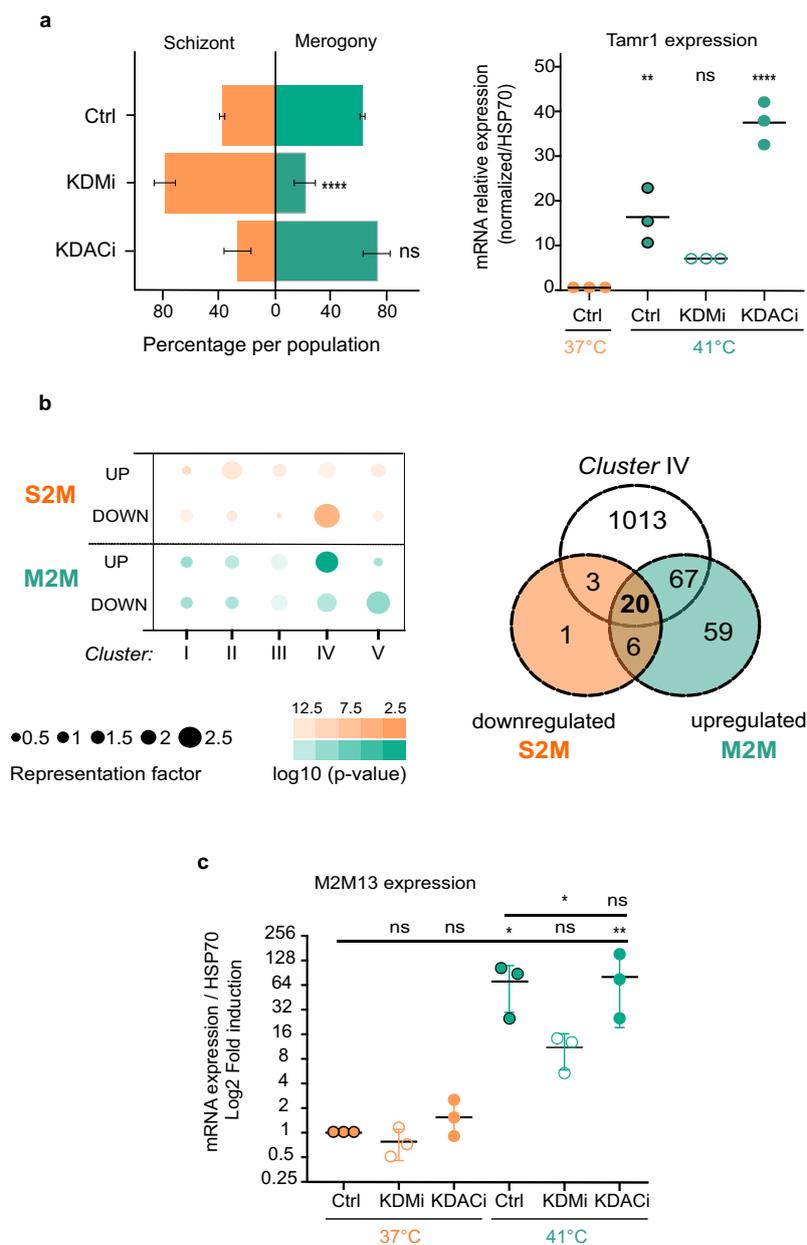


Fig. 3 H3K18 methylation is dynamic across stage transitions. **a** Differentiation to merozoites led to a decrease of H3K18me1 in parasite nuclei. Immunofluorescence analysis of *T. annulata* infected macrophages TaC12, at 37 °C (macro-schizont) and after merogony induction for 8 days at 41 °C. Host and parasite nuclei were stained with DAPI (grey) and with a specific antibody for H3K18me1 (red). The yellow box shows a zoom of merogony. Leica microscope, $\times 100$, Scale bar = 5 μm . The right panel shows quantification of immunofluorescence intensity of H3K18me1 (red) compared to DNA (grey), along the yellow cross-section line, showing reduced staining in merozoites. This experiment was performed three times independently with similar results. Immunofluorescence replicates are included in the Source Data file. **b** Changes in the level of Histone methylation and acetylation upon treatment with inhibitors of epigenetic enzymes. Fluorescence intensity quantification of the parasite histone marks H3K18me1, H3K18ac, H3K4me3 or H3K36me3 in TaC12 cells treated with either KDMi (histone demethylase inhibitor) or KDACi (histone deacetylase inhibitor). For all experiments $n = 3$ biologically independent experiments that represent the mean of intensity of 50 cells per condition for each replicate. Error bars represent the mean value \pm SD. Statistical Dunnett test multiple comparisons is two-sided with ns (not statistically significant) of K18m $p = 0.2979$ /ns of K18ac $p = 0.2435$ /ns of K4 $p = 0.5060$ /ns of K36 $p > 0.9999$ /***/ $p = 0.0001$.

exclusive with H3K18ac and correlated with exonic sequences (Fig. 2e and Supplementary Fig. 5d) ($p < 0.0001$). The genes enriched for H3K18me1 do not appear to cluster on the genome or to the group in particular chromosomal locations (Supplementary Fig. 6). Methylation of parasite H3K36 has been linked to repression of *var* genes in *Plasmodium* parasites³⁰, but we did not observe regions of strikingly high H3K36me3 enrichment in the *Theileria* genome (Supplementary Fig. 6). Hence, gene-body enrichment of the H3K18me1 modification appears to be correlated with repression of a large number of genes in *T. annulata* schizonts.

Parasite differentiation is associated with dynamic changes in H3K18 modifications. In other apicomplexan species, dynamic changes in epigenetic histone modifications accompany changes in gene expression throughout the parasite life cycle^{25,26,31}. Important work from the Shiels laboratory began to define changes in gene expression in *Theileria* parasites during stage

differentiation and implied roles for the ApiAP2 factors¹⁹. Little is known about the role of epigenetic mechanisms in regulating gene expression during *Theileria* differentiation. To investigate the dynamics of H3K18 modifications in *Theileria* parasites, we induced parasite differentiation from schizonts to merozoites ('merogony'), by the sustained culture of infected macrophages at elevated temperatures³². The induction of merogony was accompanied by a reduction in H3K18me1 staining in some parasite nuclei (Fig. 3a). After 8 days in the culture at 41 °C, we observed large patches of parasite nuclei with reduced H3K18me1 staining, despite robust H3K4me3 staining across all nuclei (Supplementary Figs. 7 and 8). This suggested that H3K18 methylation dynamics might contribute to parasite differentiation. Unfortunately, there are currently no genetic techniques available to modify the *Theileria* genome, so we are limited to pharmacological intervention. To test H3K18 dynamics experimentally, we treated cells with inhibitors of lysine demethylases (KDMi) or deacetylases (KDACi), some of the many drugs being developed to inhibit epigenetic enzymes²³. Treatment with a



demethylase inhibitor led to a 3-fold increase in parasite H3K18me1 levels and a modest decrease in H3K18ac (Fig. 3b). Conversely, treatment with an acetylase inhibitor robustly increased H3K18ac staining in parasites (Fig. 3b). Importantly, treatment with KDMi or KDACi did not affect the levels of parasite staining with antibodies against H3K4me3 or H3K36me3 (Fig. 3b), demonstrating that the inhibitors do not have a general broad effect on histone lysine methylation. With these pharmacological tools in hand, we sought to test whether these drug-induced effects on H3K18 methylation and acetylation could influence parasite differentiation. We speculate that increased H3K18 methylation might block differentiation, or increased acetylation might favour differentiation. We observed that KDMi treatment significantly reduced the extent of merogony and reduced the expression of the differentiation marker *TamR1*³²

(Fig. 4a). Conversely, treatment with KDACi enhanced *TamR1* expression, with a relatively mild impact on differentiation (Fig. 4a). These results suggested that dynamic changes in the H3K18 methylation/acetylation balance could affect parasite stage differentiation.

Previous microarray analysis identified sets of genes associated with life-stage transitions in *T. annulata*¹⁹. Comparison with these data revealed that Cluster IV genes, which are enriched for genebody H3K18me1, are over-represented in differentially expressed genes linked to the sporozoite-to-macroschizont and macroschizont-to-merozoite stage transitions (Fig. 4b and Supplementary Fig. 8). Notably, nine genes encoding *Theileria* ApiAP2 genes that could be stage-transition determinants¹⁹ are also in the list of cluster IV genes (Supplementary Table 3). We analysed the overlap between these datasets, focusing on Cluster

Fig. 4 Pharmacological treatments impact parasite differentiation. **a** KDMi and KDACi treatment impacted merogony induction in infected cells.

Quantification of cells at macroschizont (orange) or merogony (green) parasite stages after 8 days cultured at 41 °C treated with inhibitors, biologically independent experiments in triplicate, mean of the cells in schizont or merogony stage for each replicate. The right panels shows the expression levels of the parasite gene *Tamr1* (merogony marker) after 8 days at 41 °C treated with inhibitors. Levels at 41 °C were compared to 37 °C schizont controls $n = 3$ biologically independent experiments represent qPCR values of *Tamr1* expression normalized by *Hsp70* for three different induction of merogony treated or not. Error bars represent mean values \pm SD. Statistical test Dunnett's multiple comparison and two-sided test: ns = not statistically significant, $p = 0.1195$; **** $p = 0.0001$; ** $p = 0.0031$. **b** Cluster IV genes are over-represented in differentially expressed genes in sporozoite-to-macroschizont (S2M down-regulated) and macroschizont-to-merozoite (M2M up-regulated) transitions. Dot chart of the representation factor and p -value of significant overlap between differentially expressed genes derived from a published microarray¹⁹ and our H3K18me clusters. Dot colour transparency is plotted as p -value and dot size represents the representation factor. The right panel shows Venn diagram indicating the numbers of genes overlapping between cluster IV, genes upregulated in the M2M transition and genes downregulated in the S2M transition. **c** Merogony induction increased the expression of the *M2M13* gene (Cluster IV) that is upregulated during macroschizont to merozoite transition. The *M2M13* gene was affected by the epigenetic inhibitors KDMi and KDACi. RT-qPCR analysis of *M2M13* gene in infected macrophages, at 37 °C or at 41 °C for 8 days, after treatment with inhibitors, showed that the expression level of *M2M13* was significantly reduced by KDMi treatment. Levels at 41 °C were compared to 37 °C schizont controls or untreated merogony ($n = 3$ biologically independent experiments, mRNA expression of *M2M13* normalized to *Hsp70*, for three different experiments on schizont treated or not and for three inductions of merogony treated or not). Error bars represent mean values \pm SD. Statistical test Dunnett's multiple comparisons two-sided: ns = not statistically significant > 0.99 ; ** $p < 0.005$; * $p = 0.0312$.

IV genes and correlations with genes reported to be down-regulated in the sporozoite-to-macroschizont (S2M) transition and upregulated in macroschizont-to-merozoite (M2M) transition. We identified 20 candidate genes (that belong to both M2M_up and S2M_down gene sets, which we termed M2M1-M2M20) that are candidates for genes that are repressed by high H3K18me1 in macroschizonts and upregulated upon differentiation (Fig. 4b and Supplementary Table 1). We also performed a Blast2GO re-annotation of the additional 67 genes that are in the M2M_up group and contained in Cluster IV (Supplementary Table 2). Notably, the 87 genes on these lists (which are candidates for increased expression during the transition from macroschizont to merozoite) include several genes with FAINT domains and signal peptides or transmembrane domains that could be involved in host interactions. It is particularly noteworthy that three proteins (TA05870, TA16660 and TA19445) are homologues of rhopty proteins characterized in *Plasmodium* or *Toxoplasma* as functionally linked to invasion and egress (Supplementary Tables 1 and 2). Gene expression analysis showed that 5 of these 20 genes are indeed significantly induced (over 10-fold) in our hands upon merogony culture conditions (Supplementary Fig. 9a). In contrast, control genes (e.g. parasite *TajmjC1*) or bovine genes encoding actin or *Hsp70* did not significantly vary upon merogony induction (Supplementary Fig. 9b). We tested whether the drugs that affected H3K18 methylation and acetylation levels could impact the expression of the M2M genes and noted a significant tendency to be induced by treatment with KDACi (see examples in Supplementary Fig. 9c). We chose to study the *M2M13* gene (TA16660 encoding a homologue of rhopty neck proteins) as a striking example (Fig. 4c). The *M2M13* gene was induced 60-fold upon merogony differentiation compared to cells grown at 37 °C (Fig. 4c). The temperature-induced expression of *M2M13* was blunted by treatment with KDMi at 41 °C (Fig. 4c). To test whether these changes in expression were linked to changes in epigenetic effects and chromatin marks, we performed ChIP analysis of the *M2M13* gene locus (Fig. 5a). The *M2M13* gene has a peak of H3K18Ac in the promoter region and enriched H3K18me1 across the gene body (Fig. 5a). Treatment with KDMi enhanced H3K18me1 on the *M2M13* gene body and promoter (Fig. 5b), whereas the KDACi treatment led to increased H3K18ac on the promoter region (Fig. 5c). This pharmacological intervention changed H3K18 modifications that correlated with gene expression and differentiation (Fig. 4e). Thus, the balance between H3K18me1 on gene bodies and H3K18ac on gene promoters could determine the expression of

key genes associated with differentiation stage transitions in *Theileria* parasites.

The Theileria SET-domain methyltransferase TaSETup1 can methylate H3K18. The methylation of lysine residues is typically performed by methyltransferases with a characteristic SET domain³³. We mined the *T. annulata* genome²⁰ for genes encoding SET-domain containing proteins and identified five candidates (termed here TaSETup1–TaSETup5) (Supplementary Fig. 10 and Supplementary Table 4). Our analysis of expression levels showed that only one of these, the uncharacterized protein TaSETup1, was expressed in macroschizonts and significantly silenced upon merogony differentiation (Fig. 6a). We also identified two potential demethylases with JMJ domains, one of which was induced upon merogony (Supplementary Fig. 10a, b). These observations are consistent with a methylation shift during differentiation. We performed phylogenetic analysis of the parasite putative methyltransferases and found that TaSETup1 resembles a family of mammalian methyltransferases called SMYD^{34–36} proteins that have been implicated in differentiation and cancer (Supplementary Fig. 11). We used knowledge of SMYD protein structure and function to predict residues whose mutation would lead to a catalytically inactive protein (Fig. 6b, c)³⁴. Modelling on the known structure of the mammalian SMYD3³⁷ protein predicted that mutation of the histidine residue at position 206 should inhibit activity. We performed a highly sensitive, in vitro SAM methyltransferase assays³⁸ with recombinant TaSETup1 or mutant H206F. Recombinant TaSETup1 could methylate peptides corresponding to H3K18 residues to produce H3K18me1 and H3K18me2/3, whereas the H206F mutant was inactive (Fig. 7a, b). Furthermore, the recombinant TaSETup1 protein methylated core histones (Fig. 7a) as well as recombinant histone H3 or human nucleosomes (Supplementary Fig. 12a–c). We compared the activity of TaSETup1 with SMYD3, the most similar mammalian SET-domain enzyme. Recombinant TaSETup1 could methylate H3K18me1 on recombinant H3, polynucleosomes or core histone isolated from HEK cells (Supplementary Fig. 13a). In contrast, the related SMYD3 enzyme failed to methylate any of these substrates on K18. But the SMYD3 protein could methylate its preferred substrate MAP3K2³⁹ in an in vitro SAM assay (Supplementary Fig. 13b), whereas TaSETup1 could not. Finally, we performed mass spectrometry analysis of histone peptides methylated by the recombinant TaSETup1 enzyme and demonstrated that the parasite enzyme catalyzed monomethylation of the lysine residue corresponding to H3K18 (Supplementary Fig. 14). Thus,

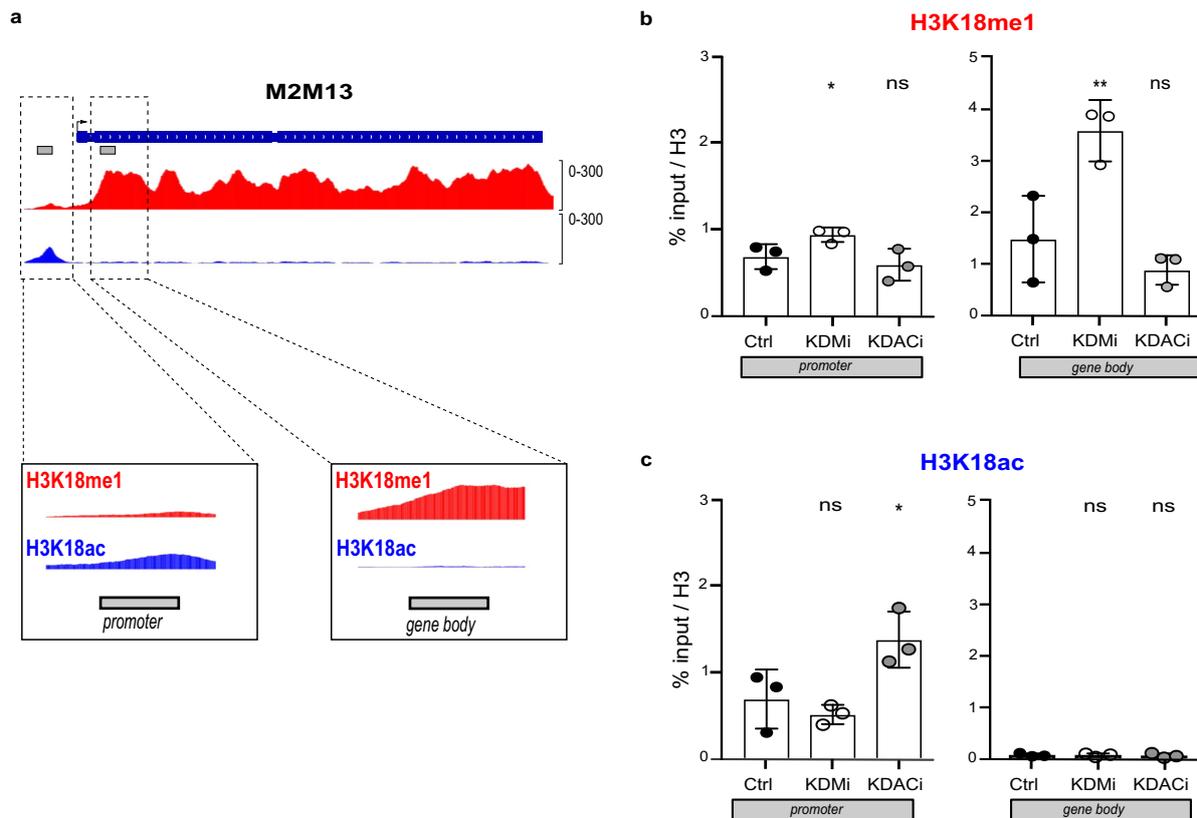


Fig. 5 Chromatin analysis of a differentiation gene. **a** Representation of the chromatin status of H3K18 at the *M2M13* locus. Chromatin immunoprecipitation ChIP-Seq analysis of the *M2M13* gene in schizont conditions (37 °C) showing H3K18Ac enrichment (blue) on the *M2M13* promoter region and H3K18me enrichment (red) on the gene body. **b** Treatment with the KDMi or KDACi inhibitors impacted the presence of H3K18me1 histone marks on the *M2M13* gene. Quantification of the H3K18me1 mark by ChIP-PCR on the *M2M13* promoter or gene-body, after treatment with epigenetic inhibitors. **c** Quantification of H3K18ac mark on the *M2M13* gene and promoter following inhibitor treatment. For all experiments $n = 3$ biologically independent experiments of ChIP qPCR. Error bars represent mean values \pm SD. Statistical test Dunnett's multiple comparison test: ns = not statistically significant $p = 0.2979$; ** $p = 0.047$; * $p = 0.0737$.

these two highly related methyltransferases exhibit a degree of specificity for different target substrates. No human methyltransferase has been demonstrated to methylate H3K18.

The genetic tools do not currently exist to test TaSETup1 function in live parasites by mutational analysis or knockdown strategies. We attempted to make antibodies that specifically recognized the TaSETup1 protein. Although we obtained antisera that recognized the immunizing antigen and recombinant TaSETup1 protein, these antibodies failed to produce satisfying results in immunoblot or immunofluorescence analysis. To circumvent these constraints, we tested the functional capacity of TaSETup1 to repress gene expression in a heterologous system as H3K18me1 was enriched on the gene bodies of repressed genes. We fused the parasite gene to a GAL4 protein and tested its repressive activity in the T-REx system⁴⁰ in which HEK293 T-REx cells contain a stably integrated luciferase (Luc) reporter gene under the control of the thymidine kinase (TK) basal promoter with five GAL4 UAS (Supplementary Fig. 15). Tetracycline-induction led to a significant decrease in luciferase expression linked to TaSETup1, which was lost when the mutant H206F was used (Fig. 7c and Supplementary Fig. 15). Additional experiments using flow cytometry sorting (FACS) of low and high H3K18me1 populations during merogony supported our conclusions that parasite differentiation is accompanied by dynamic changes in histone methylation and changes in TaSETup1 expression (Supplementary Fig. 16).

Discussion

The role of epigenetic mechanisms and histone post-translational modifications in regulating gene transcription and cellular differentiation is well-established for a broad range of mammalian genomes and model organisms^{21,22}. Indeed, the enzymes responsible for methylating or acetylating lysine residues in histone tails are identified as targets for drug therapies in a wide range of human pathologies including cancer. However, relatively little is known about how parasite genomes are regulated and the mechanisms controlling differentiation. The paucity of transcription factors in the apicomplexan genomes, suggests that epigenetic mechanisms could play key regulatory roles^{25,26}.

This study presents the first insights into how dynamic changes in epigenetic marks might regulate gene expression and stage differentiation in *Theileria* parasites. We report the first characterization of mono-methylation of the H3K18 residue in parasite histone tails. Our experimental evidence includes immunofluorescence staining of individual cells and immunoblot analysis with three independent and specific antibodies, reinforced by flow cytometry experiments and mass spectrometry analysis with a candidate recombinant methyltransferase enzyme. The H3K18me1 was observed in B cells and macrophages infected with either *T. annulata* or *T. parva* parasites and decreased upon treatment with the teroidal Buparvaquone drug. These results suggest that H3K18 methylation is a general marker of *Theileria* schizonts. Future experiments with primary clinical

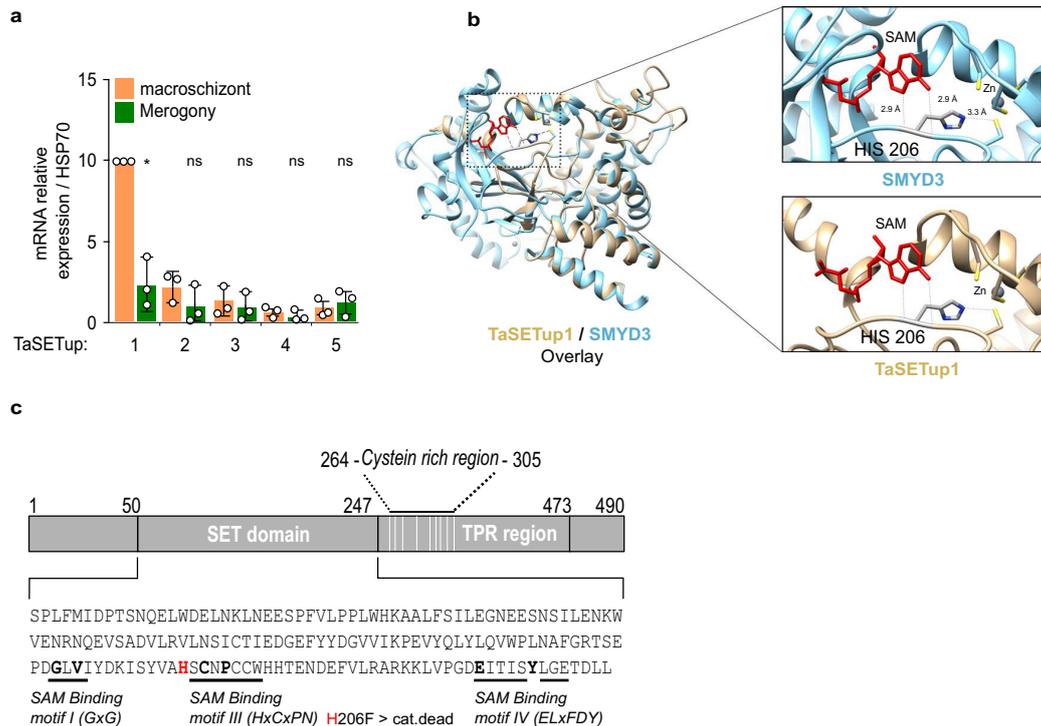


Fig. 6 The *Theileria* methyltransferase TaSETup1. **a** Analysis of expression (RT-qPCR) the *TaSETup* genes in macroschizont or merogony culture conditions (37 or 41 °C, respectively). Results were normalized to *TaSETup1* at 37 °C and represent three independent experiments ($n = 3$). Statistical test Dunnett’s multiple comparison two-sided tests showing changes upon merogony: ns=not statistically significant > 0.6389 ; $*p = 0.0488$. **b** Comparison of TaSETup1 predicted structure (beige) with the crystal structure of the human SMYD3 protein (blue, PDB ID: 6JL), with zoom window of the active site highlighting TaSETup1 H206 residue (red). **c** Schematic of the TaSETup1 protein, highlighting the SAM binding regions and the H206 residue (red).

samples from infected cows will be interesting to test when the H3K18me1 appears during the parasite life cycle. Our experiments with parasite differentiation towards merozoites suggest that H3K18me1 may prevent merogony and advancement through the parasite life cycle. Our results are consistent with a model in which the repressive function of H3K18me1 is lost on some loci during the differentiation to merozoites and that this allows the upregulation of a subclass of merogony-associated genes. Notably, the 87 proteins in the M2M_up:Cluster IV group include several potential secreted proteins (including Tpr and SfiI gene families) as well as three candidates resembling rhopty proteins (TA05870, TA16660, and TA19445) which are good candidates for proteins involved in the invasion. We characterized the *M2M13* gene encoding a potential rhopty neck protein as a test case. The observation that expression of these *M2M* genes and merogony are affected by drug treatments (KDMi inhibitors) suggests that these drugs may be potential anti-parasite reagents that merit testing using in vivo models of infection.

Currently, relatively little is known about gene regulation in *Theileria* genomes. There is a paucity of transcription factors in all apicomplexan genomes. It is possible that some of the *Theileria* ApiAP2 genes could be stage-transition determinants¹⁹, and it is noteworthy that some are also in the list of cluster IV genes (Supplementary Table 3). This is interesting as ApiAP2 changes have been linked to *Theileria* differentiation and the PfAP2-G homologue drives an epigenetically regulated master switch that initiates gametocytogenesis in *Plasmodium*^{19,41,42}. The link between epigenetic and transcription factor networks in regulating parasite differentiation merits further investigation.

In addition to the novel H3K18me1 epigenetic mark, we identified TaSETup1 as the first SET-domain enzyme capable of H3K18 mono-methylation and the first characterized epigenetic actor in the *Theileria* genome. As there are only five SET-domain proteins in *Theileria* genomes, it is likely that parasite methyltransferases are multifunctional, with diverse substrate specificities. Furthermore, there is an emerging interest in non-histone targets⁴³ and TaSETup1 homologues in other apicomplexa species that may have non-histone substrates. Interestingly, the *Toxoplasma* homologue TgAKMT is a cytoplasmic protein important for parasite motility^{44,45} and the *Plasmodium* homologue PfSET7 can methylate H3K4 and H3K9, but also has cytoplasmic functions⁴⁶. Nonetheless, H3K18 methylation has been detected in these parasites³¹ and these enzymes could have both cytoplasmic and nuclear functions depending on the parasite life stage. Indeed, TaSETup1 resembles SMYD proteins that have both cytoplasmic and nuclear targets and functions³⁴. Studies of parasite epigenetics shed new light on gene regulation mechanisms; another example is the recent discovery of mono-methylated H4K31⁴⁷ in *Toxoplasma* parasites. Methyltransferases represent versatile regulatory enzymes and the drugs²³ being developed to block methylation in cancers could be repurposed for infectious diseases. The study of epigenetic regulation in *Theileria* is likely to be rich and fruitful⁴⁸ and our results already suggest that targeting the methylation machinery to block merogony could be a promising therapeutic strategy.

Methods

Cell culture and treatment. All bovine cell lines were previously documented: TBL3 cells were derived from in vitro infection of the spontaneous bovine B lymphosarcoma cell line, BL3, with Hissar stock of *T. annulata*. TaC12²⁷ is a line of *T. annulata*-infected bovine macrophages. The TpMD409 lymphocyte cell line is

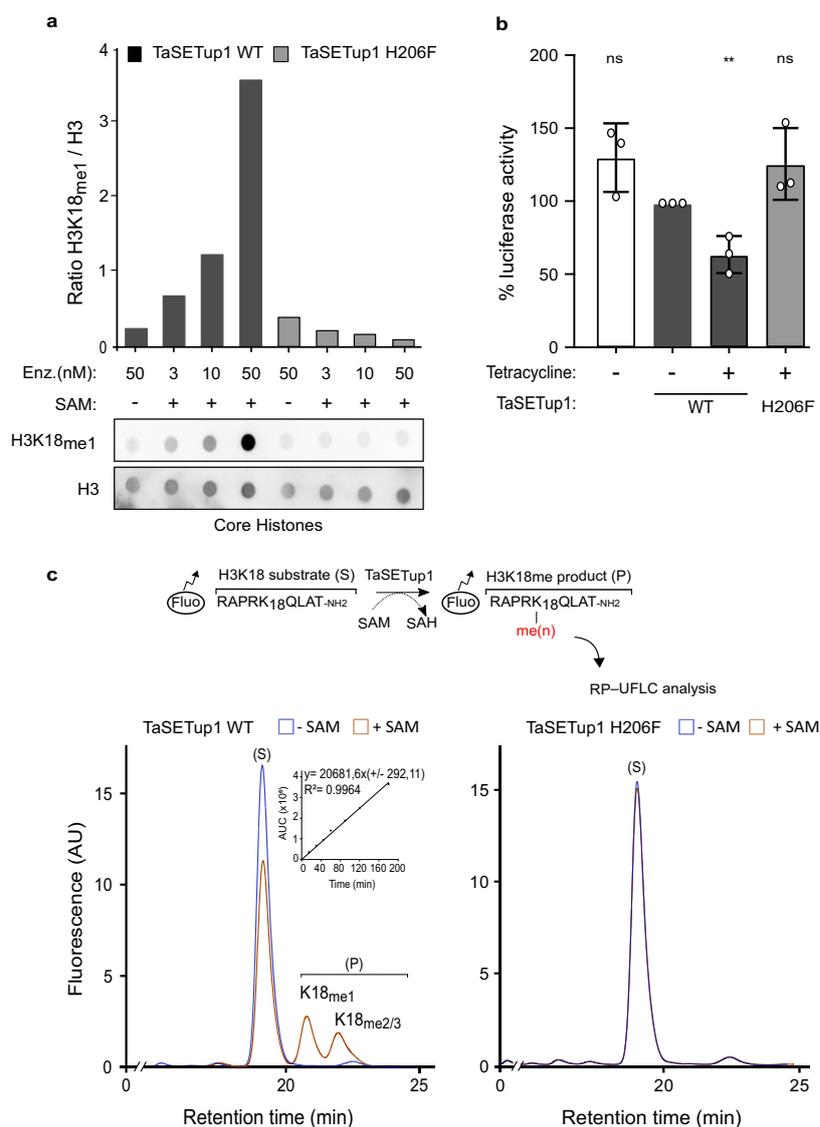


Fig. 7 The *Theileria* TaSETup1 can methylate H3K18 and repress gene expression. **a** Methyltransferase assay of recombinant TaSETup1 (wild-type WT or mutant H206F) incubated with or without SAM and core histones followed by immuno-dot-blot detection with H3K18me1 antibody. The quantification results were normalized to H3. This result is representative of three independent experiments showing similar outcomes. **b** Assay of TaSETup1 methyltransferase activity by quantification of fluorescent H3K18 peptide (substrate S and methylated product P). Chromatograms show mono-methylated (K18me1) and di/tri methylated (K18me2/3) product in presence or absence of SAM for WT and mutant enzymes. Inset: Integration of the peak (AUC area under the curve). **c** Recruitment of GAL4-TaSETup1 (but not the GAL-TaSETip1 H206F mutant) caused repression of the *Luciferase* transgene in T-Rex cells in the presence Tetracycline (48 h). The % Luciferase activity represents the mean of $n = 3$ biologically independent experiments. Error bars represents mean values \pm SD.

infected with *T. parva*. Cells were cultured in RPMI 1640 (Gibco-BRL), supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS), 4 mM L-glutamine, 25 mM HEPES, 10 mM β -mercaptoethanol and 100 mg/ml of penicillin/streptomycin in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. HEK 293T-RexLuc cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and 100 mg/ml of penicillin/streptomycin in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. The anti-parasite drug Buparvaquone (BW720c) was used at 50 ng/ml for 48 h (Chemos GmbH, ref: 88426-33-9). The KDM inhibitor (KDMi) is the well-characterized, broad-spectrum lysine demethylase inhibitor tranylcypromine (TCP) (a generous gift from A. Mai, Sapienza University, Rome) used at 1 μ M, 48h and the KDAC inhibitor (KDACi) 24 h at 40 nM (compound FR235222, a generous gift from MA. Hakimi). The KDM inhibitor (KDMi) is used at 1 μ M, 48 h and the KDAC inhibitor (KDACi) 24 h at 40 nM (compound fr235222 from MA. Hakimi, IAB, Grenoble, France).

Merogony induction. Macroschizont-infected TaC12 cells were induced to differentiate to merogony by increasing the culture temperature to 41 °C³². Cells were passaged each time they reached confluence and 2×10^6 cells collected at day 0 (macroschizont stage) and day 8 (merogony stage) for RNA extraction and 4×10^3 cells per immunofluorescence at the same time-points.

Immunofluorescence analysis. Cultured *T. annulata*-infected macrophages (TaC12) or B cells (TBL3) were washed with PBS containing 1 mM EDTA and 3×10^4 cells per slide were centrifuged with Cytospin (10 min at 277 \times g) to adhere to the slide. Cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde for 15 min and subsequently permeabilised in 0.2% Triton X-100 (prepared in PBS) for 10 min. Fixation, permeabilisation and all the following steps were carried out at room-temperature. Slides were blocked with PBS 0.2% Tween (PBST)-1% BSA for 30 min. Primary

antibodies were diluted in PBST and incubated for 1 h at the following dilutions: rabbit anti-H3K18me1 (ab177253, Abcam), 1:5000; rabbit anti-H3K18ac (9675S, Cell signaling) 1:800; rabbit anti-H3K4me3 (pAb-003-050, Diagenode) 1:200. Cells were subsequently washed three times with PBST and incubated with secondary antibody for 30 min at the following dilutions: Alexa594-conjugated donkey anti-rabbit antibody, 1:1000. Cells were washed three times with PBST and finally, mounted on coverslips adding ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI mounting reagent (Thermo Fischer Scientific). Samples were analysed using a Leica DMI 6000 epifluorescence microscope. Images were generated and processed using Metamorph and ImageJ software. For H3K18ac and H3K18me1 intensity quantification in the parasite, for each cell, we calculated the mean intensity in the entire parasite using ICY software, divided by the number of parasite nuclei per host cell. The counting of cells in the macroschizont or merogony stage was done using ImageJ. We defined a threshold for the Schizont/Merogony cycle stage, at 80 parasites per cell.

Protein extraction and Western blot analysis. For all the cell lines, 2×10^7 cells were collected and histone extraction was performed using the Abcam Kit protocol. Histones were resolved on NuPage 4–12% acrylamide gradient SDS–PAGE gel (Invitrogen) and transferred onto nitrocellulose membranes in Tris–glycine transfer buffer. Membranes were blocked and incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies: H3K18me1(ab177253) 1:20,000; H3K18ac (ab1191) 1:2000; H3 (ab1791) 1:10,000. Membranes were incubated with the appropriate secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (HRP), revealed using West Dura kit and the Licor detection system.

Luciferase reporter activity. HEK 293T-RexLuc cells were grown in DMEM supplemented with FBS Tetracycline-free (EuroBio) and transfected with the pcDNA4-TO-Gal4-G9a, pcDNA4-TO-Gal4-TaSetup1, pcDNA4-TO-Gal4-PrSet7, and pcDNA4-TO-Gal4-TaSetup1-H207F plasmids using lipofectamine 2000. The proteins were induced 5 h post-transfection with Tetracycline (final concentration of 1 µg/ml). Transfection efficiencies were normalized to Renilla activity by co-transfection of a pRL-TK Renilla reporter plasmid at 150 ng. Luciferase assays were performed 36 h post-induction using the Dual-Glo Luciferase assay system (Promega) in a microplate luminometer. The percentage of luciferase activity was represented as the ratio Firefly/Renilla luminescence, compared with the non-induced transfected cells.

Plasmids and transfection. pcDNA4-TO-Gal4-G9a and pcDNA4-TO-Gal4-PrSet7 were a gift from S. Ait-Si-Ali. pcDNA4-TO-Gal4TaSetup1 and pcDNA4-TO-Gal4-TaSetup1-H207F were generated from pcDNA4-TO-Gal4-G9a cloning TaSetup1 cDNA from *Theileria* infected macrophages RNA, with restriction enzymes *EcoRI* and *NotI*. Each plasmid was transfected in HEK 293T-RexLuc cells with Lipofectamine 2000 in a concentration gradient (0.5, 1 and 2 µg). pRL-TK Renilla reporter plasmid was co-transfected at 150 ng.

RNA extraction and RT-qPCR. For all cell conditions, total RNA was extracted using a Nucleospin RNA extraction kit (MachereyNagel) following the manufacturer's protocol. 1 µg of total RNA was reverse transcribed with Superscript III Reverse transcriptase Kit (Invitrogen). Real-time quantitative PCR was performed to analyse relative gene expression levels using SyberGreen Master Mix (Applied Biosystem) following the manufacturer's protocol. Relative expression values were normalized with housekeeping gene mRNA *HSP70*. Primer sequences are listed in Supplementary Table 5.

RNA-Seq analysis. 5×10^6 cells (BL3 or TBL3) were used as starting material to extract RNA. Extraction was performed following the TRI-reagent (SIGMA, T-9424) protocol. Library preparation and sequencing were performed at the GenomIC² sequencing facility (https://www.institutcochin.fr/core_facilities/genomesequencing-studies?set_language=en). Briefly, poly-A Library preparation was done using the Illumina TrueSeq stranded protocol and paired end 75 bp sequencing was performed on a Illumina NextSeq 500 to a depth of over 40M reads per sample. Read-quality control was performed using fastQC (v0.11.7) and Rsubread⁴⁹ (v1.26.1) qualityScore function. Read mapping was performed using the Rsubread align function on an indexed version of *T. annulata* genome assembly ASM322v1.32. RPKM values were obtained using the featureCounts function from the Rsubread package using the same ASM322v1.32 annotations. Visualisation and snapshots of bam files were performed using IGV (v2.3.91) and further modified using inkscape (v0.92.3). Kruskal–Wallis and pairwise Wilcoxon Statistical testing on RPKM values from cluster I–V was performed using the ggpubr (v0.2) R package.

Chromatin immunoprecipitation and next-generation sequencing. BL3 and TBL3 cells (2×10^7) were fixed for 10 min with 1% formaldehyde at room temperature. Fixation was stopped with 125 mM glycine for 5 min. Fixed cells were washed 2× with cold PBS. After washes, cells were resuspended in 1 ml cell lysis buffer (Hepes pH 7.8 25 mM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, DTT 1 mM, NP-40 0.1%), incubated on ice for 10 min, centrifuged (492×g, 5 min, 4 °C) before

resuspension in 1 ml Nuclear Lysis Buffer (Hepes pH 7.9 50 mM, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Triton X100 1%, Na-deoxycholate 0.1%, SDS 0.5%). After the nuclei were obtained, the chromatin was sheared with a Bioruptor pico to yield 100–400 bp DNA fragments; the sonication conditions were high intensity 30 s ON/30 s OFF, for 12 min. Following centrifugation (10 min, 24,104×g) the supernatant was used for immunoprecipitation. Sheared chromatin was incubated overnight at 4 °C with anti-H3K18me1 (Abcam 177253), anti-H3K18Ac (Cell Signaling 9675S), anti-H3K4me3 (Millipore 07-473), anti-H3K36me3 (ab9050), or IgG isotype control (Cell Signaling 27295). The immunoprecipitation was carried out using Dynabeads protein G (Thermo Fisher Scientific) for 3 h at 4 °C. Immunoprecipitates were washed four times with IP buffer, once with wash buffer (Tris pH 8 20 mM, LiCl 250 mM, EDTA 1 mM, NP-40 0.5%, Na-deoxycholate 0.5%), and twice with elution buffer (Tris pH 8 20 mM, EDTA 1 mM). Ten immunoprecipitated chromatin was eluted by incubating beads with elution buffer supplemented with 1% SDS at 65 °C. Both input and ChIP DNA were then treated with RNase A for 1 h at 37 °C, followed by the addition of Proteinase K and overnight incubation at 65 °C to reverse cross-link. DNA was then purified with NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit (MachereyNagel) following the manufacturer's instructions.

ChIP-Seq libraries were prepared using the MicroPlex v2 kit (Diagenode) according to the manufacturer's instructions. 10 µl of DNA material was used and a 10-cycle PCR was performed as a final amplification of the libraries. Libraries were sequenced on a NextSeq 500 system (Illumina). A 75-base single-end run was performed, with the libraries loaded as a 2pM equimolar pool with 1% of internal control sequences (PhiX–Illumina). 594 million reads were generated with Q30 = 86.37%. Raw reads were converted to Fastq files and their quality assessed using Aozan (version 2.2.1)39. Read-quality control was performed using fastQC (v0.11.7) and Rsubread⁴⁹ (v1.26.1) quality score function. Read mapping was performed using the Rsubread align function on an indexed version of *Theileria annulata* genome assembly ASM322v1.32. Biological replicates correlation was assessed using PCA and Spearman/Pearson correlation coefficient computation using deepTools⁵⁰ (v3.1.1) bamCoverage, multiBamSummary and plotCorrelation tools. K-means clustering on H3K18me1 ChIPseq analysis was performed using the computeMatrix and plotHeatmap tools. Circos plot of ChIP-seq and RNA-seq experiment was done using circline⁵¹ (v0.4.5).

Gene set overlaps. Representation factor and associated probability between genes from Cluster IV and stage-specific differentially expressed genes (from reported study¹⁹) were calculated using the software available at http://nemates.org/MA/progs/overlap_stats.html. Briefly, the representation factor corresponds to the number of overlapping genes divided by the expected number of overlapping genes drawn from two independent groups. Associated probability was computed using an exact hypergeometric test. Details of the computations can be found at http://nemates.org/MA/progs/representation_stats.html. R and ggplot2 packages were used to produce several figure panels.

Phylogenetic analysis. SET domain proteins were retrieved from interproDv66⁵² using the SET domain identifier IPR0014. *Homo sapiens* SET proteins were further curated to include only some representatives of the major SET families. Proteins were aligned using mafft⁵³ v7.245 with option --localpair --maxiterate 1000 --ep 0. Alignment was examined using Jalview⁵⁴ v2.10.5 and phylogenetic tree inferred with Ultra-Fast bootstrap and alrt branch support using iqtree^{55–57} v1.5.5 with options –m TEST –bb 1000 –alrt 1000. FigTree v1.4.3 was used for tree annotation. Computations were performed using Docker containers available at <https://hub.docker.com/u/parisepigenetics/>.

Reannotation of parasite genes. *T. annulata* protein sequences were submitted to the blast2GO⁵⁸ pipeline for annotation using standard parameters.

Cloning and site-directed mutagenesis. Total cellular RNA from infected macrophages (TaC12) was converted to cDNA using Phusion high fidelity DNA polymerase (ThermoFisher). The open reading frame of TaSETup1 (TA06820, piroplasmaDB) (refseq_948938) was PCR amplified with Q5 high fidelity DNA polymerase (NEB) and cloned by BP recombination reaction into entry clone pDONR207 using GATEWAY[®] cloning technology. The positive entry clone containing TaSETup1 was shuttled into pDEST17 His Tag Expression vector by LR recombination reaction using GATEWAY[®] cloning technology. For site-directed mutagenesis of TaSETup1, Histidine 206 residue was mutated into phenylalanine using Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (ThermoFisher). The resulting positive clone was transformed to competent *E. coli* host HI-control BL21 (DE3) cells for protein expression and purification.

Protein expression and purification. A single colony of pDEST17 TaSETup1 WT, or H206F, was inoculated into 5 ml of LB broth containing 100 µg/ml ampicillin. The overnight culture was transferred to 1 l of fresh medium and was grown at 37 °C until OD value of 0.7 at 600 nm was reached. Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 750 µM and grown overnight at 16 °C. Cells were harvested by centrifugation at 2490×g for 20 min and the pellet re-suspended for 30 min at 4 °C under agitation in cold lysis buffer

(300 mM NaCl in PBS 1×, pH 8, triton 1%, lysozyme 1 mg/ml, 10 mM imidazole, cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail). The cells were disrupted by sonication on ice and clarified by centrifugation at 16,000×g for 30 min at 4 °C. Proteins carrying the histidine tag were purified using HIS-Select® Nickel Affinity Gel. Briefly, the clarified lysate was incubated with affinity beads for 3 h at 4 °C under agitation and then transferred to a chromatography column. After extensive washing, the histidine-containing protein was eluted from the column using 5 column volumes of elution buffer (300 mM NaCl in PBS 1×, pH 8, 300 mM Imidazole). Samples were subjected to buffer exchange into the low salt buffer (Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8) using PD-10 Desalting Columns containing Sephadex G25 resin (GE Healthcare). Desalted samples were concentrated using an Amicon Ultra centrifugal filter units (cutoff 10 kDa, EMD Millipore) and subjected to gel filtration using a HiLoad 16/60 Superdex 200 size-exclusion column using an AKTA purifier system (Cytiva). The sample was eluted using the low salt buffer and fractions containing HIS-tagged protein were pooled, concentrated using Amicon Ultra centrifugal filter units (cutoff 10 kDa) and analysed by SDS-PAGE gel electrophoresis and Coomassie staining.

RP-UFLC-based separation and quantification of the fluorescein-labelled peptide substrate of TaSETup1 (FAM-H3K18) and its methylated products (FAM-H3K18me). A 9-amino-acid peptide derived from the sequence of human histone H3.1 protein and containing the lysine 18 residue was synthesized and conjugated to fluorescein amide (FAM) on its N-terminus and modified by amidation (NH₂) on its C-terminus (Proteogenix, France). The lysine 14 was mutated to arginine in order to only monitor Lys-18 TaSETup1-dependent methylation. The peptide was as follows: FAM- R₁₈APRK₁₈QLAT-NH₂. A mono, di, and trimethylated different forms of H3K18 (H3K18_{me1/me2/me3}) peptide was also synthesized and used as standard. The lysine methyltransferase reaction was carried out overnight at room temperature in methylation buffer (Tris 50 mM pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM DTT) containing 75 μM of the peptide substrate, 3 μM of enzyme and with or without 200 μM of S-Adenosyl methionine (SAM). Samples containing H3K18 peptide (substrate) and its methylated forms (products) were separated by RP-UFLC (Shimadzu) using Kromasil 100-5-C18 column 4.6 × 250 mm, 5 μm particle size at 40 °C. The mobile phase used for the separation consisted of two solvents. Solvent A containing water with 0.1% perchloric acid (HClO₄) and solvent B containing acetonitrile with 0.12% trifluoroacetic acid (TFA). Separation was performed by an isocratic flow as followed: 80% A/20% B, rate of 1 ml/min, time of run = 27 min. H3K18 peptide (substrate) and its methylated forms (products) were monitored by the fluorescence emission (λ = 530 nm) after excitation at λ = 485 nm and quantified by integration of the peak absorbance area, employing a calibration curve established with various known concentrations of peptides.

Histone methyltransferase in vitro assays. Recombinant histone H3 (NEB), H3 from calf Thymus (Sigma), or core histone purified from chicken erythrocytes (Sigma) (500 ng) were mixed with or without S-adenosyl methionine (100 μM final) in 1× HMT buffer containing 50 mM Tris pH 8.0, 20 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5% glycerol, 1 mM DTT in a final volume of 25 μl and incubated at room temperature for 2 h. Samples mixtures were immobilized on nitrocellulose membrane using Bio-Dot® microfiltration apparatus (Bio-Rad) and blocked with 5% non-fat milk in TBS-Tween for 1 h. After three washes, membranes were incubated with antibodies against H3 (1:2000), H3K18me1 (1:1000), at 4 °C overnight. Membranes were washed three times for 10 min and incubated with a 1:5000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody for 1 h at room temperature and developed with the Pierce ECL Western Blotting Substrate according to the manufacturer's protocol.

Sample preparation for LC-MS/MS analysis. 50 μg of an H3-derived 14-mer peptide flanking the lysine 18 (GGKAPRKQLATKAA-NH₂, Proteogenix) were incubated with 3 μg TaSETup1 and with or without 1 mM SAM for 2 h at room temperature. The reaction was then stopped by cooling and the samples were analysed by LC-MS/MS as follows.

LC-MS/MS acquisition. The peptide solution was desalted using ZipTip μ-C18 Pipette Tips (Millipore) and analysed by an Orbitrap Tribrid Fusion mass spectrometer in positive mode (Thermo Scientific) coupled to a Nano-LC Proxeon 1200 equipped with a NSI EASY-spray ion source (Thermo Scientific). Peptides were separated by liquid chromatography with the following parameters: Acclaim PepMap100 C18 pre-column reversed-phase (2 cm, 3 μm, 100 Å), EASY-spray C18 column reversed phase (P/N ES805A, 75 cm, 75 μm, 2 μm, 100 Å), 300 nL/min flow rate, gradient from 95% solvent A (water, 0.1% formic acid) to 40% solvent B (80% acetonitrile, 0.1% formic acid) over a period of 120 min, followed by a column regeneration of 20 min, giving a total run time of 140 min. Peptides were analysed in the Orbitrap cell, in full ion scan mode, at a resolution of 120,000 with a mass range of *m/z* 350–1550 and an AGC target of 4 × 10⁵. Fragments were obtained by high collision-induced dissociation (HCD) activation with a collisional energy of 27%, and a quadrupole isolation window of 1.6 Da. MS/MS data were acquired in the Ion trap in a Top-Speed mode with 3 s cycles, with an AGC target of 1 × 10⁴ and with a dynamic exclusion of 60 s. MS/MS of most intense precursor were firstly

acquired. Peptides with charge states = 1–8 and unassigned charge states were included for the acquisition. The maximum ion accumulation times were set to 100 ms for MS acquisition and 35 ms for MS/MS acquisition.

LC-MS/MS data processing. The LC-MS/MS raw files were processed using the Sequest search engine of Proteome Discoverer 2.4 (Thermo Fisher Scientific). The peptide identification was done in No-enzyme mode with a custom database containing only the peptide sequence. The precursor mass tolerance was set to 7 ppm and the fragment mass tolerance to 0.5 Da. Validation of spectra was done with the “Fixed value PSMs validator” node, which performs validation of PSMs (Peptide Spectrum Matches) based on score thresholds defined for the search nodes.

On proteome Discoverer 2.4, the following dynamic modifications were searched: Methylation (K), Dimethylation (K), Trimethylation (K), amidated (C-terminus of peptide) and HCysThiolactone (K).

Characterization of H3K18me1 antibody specificity. 2 μg of 5-FAM coupled short peptides (Proteogenix) flanking the unmodified, monomethylated, dimethylated, trimethylated or acetylated lysine of interest (H3K4: ARTKQTARRSK, H3K9: RQTARKSTGG, H3K14: STGGKAPRR, H3K18: RAPRKQLAT, H3K27: TKAARKSAPAT and H3K36:

TGGV₁₈KRPHR) were transferred on nitrocellulose membrane using Bio-Dot® microfiltration apparatus (Bio-Rad) and blocked with 5% non-fat milk in PBS-Tween for 1 h. Membranes were then incubated with antibodies against H3K18me1 (Abcam #ab177253, Active Motif #31259 and a home-made antibody provided by Jane Mellor's laboratory) (1:1,000) or H3K36me3 (Abcam #ab9050) (1:10,000) at 4 °C overnight. Membranes were washed three times with PBS-Tween for 10 min and incubated with a 1:20,000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody for 1 h at room temperature. Membranes were finally developed with the Pierce ECL Western Blotting Substrate according to the manufacturer's protocol.

Flow cytometry analysis. Cells were washed once with PBS and then fix overnight in 0.5% PFA in PBS at 4 °C. After centrifugation (5 min at 300×g, 4 °C), cells were washed in PBS, recentrifuged and resuspended in 0.1% Triton-X (5 min) then washed once in FACS Buffer (cold PBS, 20 mM Hepes and 0.5% BSA). Then, primary antibodies were added in FACS buffer and incubated 20 min at 4 °C. Cells were washed with FACS buffer and repeat with secondary antibody (at the same dilution conditions as immunofluorescence experiments above). Cells were washed again with FACS buffer and resuspended in 200 μl of FACS buffer for flow cytometry analysis.

The sequences of all primers and oligonucleotides used in this study are listed in Supplementary Table 5.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

All data generated or analysed during this study are included in this published article. The RNA-Sequencing and ChIP-Seq data have been deposited to the ENA database with the study identifier #PRJEB33792. The Zenodo access link is provided (<https://doi.org/10.5281/zenodo.3370034>) DOI number: <https://doi.org/10.5281/zenodo.3370034>. Content description: This repository provides bigwig files for ChIP and RNA sequencing experiments in *Theileria annulata*. DeepTools generated Coverage files, ReadCount normalised files and SES normalised files are provided. Also provided are genome and annotation files for visualisation with IGV software. The Mass Spectrometry proteomics data were deposited in the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD024599. Source data are provided with this paper.

Received: 31 July 2020; Accepted: 14 April 2021;

Published online: 28 May 2021

References

- Maier, A. G., Matuschewski, K., Zhang, M. & Rug, M. *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* **35**, 481–482 (2019).
- Carolino, K. & Winzeler, E. A. The antimalarial resistome—finding new drug targets and their modes of action. *Curr. Opin. Microbiol.* **57**, 49–55 (2020).
- Dumaine, J. E., Tandel, J. & Striepen, B. *Cryptosporidium parvum*. *Trends Parasitol.* **36**, 485–486 (2020).
- Innes, E. A., Chalmers, R. M., Wells, B. & Pawlowic, M. C. A one health approach to tackle Cryptosporidiosis. *Trends Parasitol.* **36**, 290–303 (2020).

5. Tretina, K., Gotia, H. T., Mann, D. J. & Silva, J. C. *Theileria*-transformed bovine leukocytes have cancer hallmarks. *Trends Parasitol.* **31**, 306–314 (2015).
6. Cheeseman, K. & Weitzman, J. B. Host–parasite interactions: an intimate epigenetic relationship. *Cell. Microbiol.* **17**, 1121–1132 (2015).
7. Dobbelaere, D. A. E. & Rottenberg, S. *Theileria*-induced leukocyte transformation. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 377–382 (2003).
8. Dobbelaere, D. & Heussler, V. Transformation of leukocytes by *Theileria parva* and *T. annulata*. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 1–42 (1999).
9. Medjkane, S., Perichon, M., Marsolier, J., Dairou, J. & Weitzman, J. B. *Theileria* induces oxidative stress and HIF1 α activation that are essential for host leukocyte transformation. *Oncogene* **33**, 1809–1817 (2014).
10. Metheni, M., Lombès, A., Bouillaud, F., Batteux, F. & Langsley, G. HIF-1 α induction, proliferation and glycolysis of *Theileria*-infected leukocytes. *Cell. Microbiol.* **17**, 467–472 (2015).
11. Lizundia, R. et al. The JNK/AP-1 pathway upregulates expression of the recycling endosome rab11a gene in B cells transformed by *Theileria*. *Cell. Microbiol.* **9**, 1936–1945 (2007).
12. Tretina, K. et al. *Theileria* parasites subvert E2F signaling to stimulate leukocyte proliferation. *Sci. Rep.* **10**, 3982 (2020).
13. Dessauge, F. et al. c-Myc activation by *Theileria* parasites promotes survival of infected Blymphocytes. *Oncogene* **24**, 1075–1083 (2005).
14. Marsolier, J. et al. OncomiR addiction is generated by a miR-155 feedback loop in *Theileria*-transformed leukocytes. *PLoS Pathog.* **9**, e1003222 (2013).
15. Villares, M., Berthelet, J. & Weitzman, J. B. The clever strategies used by intracellular parasites to hijack host gene expression. *Semin. Immunopathol.* **42**, 215–226 (2020).
16. Marsolier, J., Perichon, M., Weitzman, J. B. & Medjkane, S. Secreted parasite Pin1 isomerase stabilizes host PKM2 to reprogram host cell metabolism. *Commun. Biol.* **2**, 152 (2019).
17. Marsolier, J. et al. *Theileria* parasites secrete a prolyl isomerase to maintain host leukocyte transformation. *Nature* **520**, 378–382 (2015).
18. Medjkane, S. & Weitzman, J. B. Intracellular *Theileria* parasites PIN down host metabolism. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 134 (2020).
19. Pieszko, M., Weir, W., Goodhead, I., Kinnaird, J. & Shiels, B. ApiAP2 factors as candidate regulators of stochastic commitment to merozoite production in *Theileria annulata*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003933 (2015).
20. Pain, A. et al. Genome of the host-cell transforming parasite *Theileria annulata* compared with *T. parva*. *Science* **309**, 131–133 (2005).
21. Husmann, D. & Gozani, O. Histone lysine methyltransferases in biology and disease. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 880–889 (2019).
22. Jambhekar, A., Dhall, A. & Shi, Y. Roles and regulation of histone methylation in animal development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 625–641 (2019).
23. Arrowsmith, C. H., Bountra, C., Fish, P. V., Lee, K. & Schapira, M. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 384–400 (2012).
24. Greer, E. L. & Shi, Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 343–357 (2012).
25. Bougdour, A., Braun, L., Cannella, D. & Hakimi, M. A. Chromatin modifications: implications in the regulation of gene expression in *Toxoplasma gondii*. *Cell. Microbiol.* **12**, 413–423 (2010).
26. Scherf, A., Lopez-Rubio, J. J. & Riviere, L. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu. Rev. Microbiol.* **62**, 445–470 (2008).
27. Huber, S., Karagenc, T., Ritler, D., Rottenberg, S. & Woods, K. Identification and characterisation of a *Theileria annulata* proline-rich microtubule and SH3 domain-interacting protein (TaMISHIP) that forms a complex with CLASP1, EB1, and CD2AP at the schizont surface. *Cell. Microbiol.* **20**, e12838 (2018).
28. Peterson, C. L. & Laniel, M.-A. Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* **14**, R546–R551 (2004).
29. Li, J., Ahn, J. H. & Wang, G. G. Understanding histone H3 lysine 36 methylation and its deregulation in disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 2899–2916 (2019).
30. Jiang, L. et al. PfSETvs methylation of histone H3K36 represses virulence genes in *Plasmodium falciparum*. *Nature* **499**, 223–227 (2013).
31. Coetzee, N. et al. Quantitative chromatin proteomics reveals a dynamic histone posttranslational modification landscape that defines asexual and sexual *Plasmodium falciparum* parasites. *Sci. Rep.* **7**, 607 (2017).
32. Schmuckli-Maurer, J., Shiels, B. & Dobbelaere, D. A. Stochastic induction of *Theileria annulata* merogony in vitro by chloramphenicol. *Int. J. Parasitol.* **38**, 1705–1715 (2008).
33. Dillon, S. C., Zhang, X., Triebel, R. C. & Cheng, X. The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol.* **6**, 227 (2005).
34. Spellmon, N., Holcomb, J., Trescott, L., Sirinupong, N. & Yang, Z. Structure and function of SET and MYND domain-containing proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 1406–1428 (2015).
35. Cock-Rada, A. M. et al. SMYD3 promotes cancer invasion by epigenetic upregulation of the metalloproteinase MMP-9. *Cancer Res.* **72**, 810–820 (2012).
36. Codato, R. et al. The SMYD3 methyltransferase promotes myogenesis by activating the myogenin regulatory network. *Sci. Rep.* **9**, 17298 (2019).
37. Xu, S., Wu, J., Sun, B., Zhong, C. & Ding, J. Structural and biochemical studies of human lysine methyltransferase Smyd3 reveal the important functional roles of its post-SET and TPR domains and the regulation of its activity by DNA binding. *Nucleic Acids Res.* **39**, 4438–4449 (2011).
38. Duval, R. et al. An acetyltransferase assay for CREB-binding protein based on reverse phaseultra-fast liquid chromatography of fluorescent histone H3 peptides. *Anal. Biochem.* **486**, 35–37 (2015).
39. Dai, B. et al. SET and MYND domain-containing protein 3 is overexpressed in human glioma and contributes to tumorigenicity. *Oncol. Rep.* **34**, 2722–2730 (2015).
40. Li, G. et al. Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes Dev.* **24**, 368–380 (2010).
41. Brancucci, N. M. B. et al. Heterochromatin Protein 1 secures survival and transmission of malaria parasites. *Cell Host Microbe* **16**, 165–176 (2014).
42. Filarsky, M. et al. GDV1 induces sexual commitment of malaria parasites by antagonizing HP1-dependent gene silencing. *Science* **359**, 1259–1263 (2018).
43. Carlson, S. M. & Gozani, O. Nonhistone lysine methylation in the regulation of cancer pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a026435 (2016).
44. Heaslip, A. T., Nishi, M., Stein, B. & Hu, K. The motility of a human parasite, *Toxoplasma gondii*, is regulated by a novel lysine methyltransferase. *PLoS Pathog.* **7**, e1002201 (2011).
45. Sivagurunathan, S., Heaslip, A., Liu, J. & Hu, K. Identification of functional modules of AKMT, a novel lysine methyltransferase regulating the motility of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **189**, 43–53 (2013).
46. Chen, P. B. et al. *Plasmodium falciparum* PfSET7: enzymatic characterization and cellular localization of a novel protein methyltransferase in sporozoite, liver and erythrocytic stage parasites. *Sci. Rep.* **6**, 21802 (2016).
47. Sindikubwabo, F. et al. Modifications at K31 on the lateral surface of histone H4 contribute to genome structure and expression in apicomplexan parasites. *Elife* **6**, e29391 (2017).
48. Cheeseman, K. & Weitzman, J. B. Host-parasite interactions: an intimate epigenetic relationship. *Cell. Microbiol.* **17**, 1121–1132 (2015).
49. Liao, Y., Smyth, G. K. & Shi, W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res.* **41**, e108 (2013).
50. Ramirez, F. et al. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* **44**, W160–W165 (2016).
51. Gu, Z., Gu, L., Eils, R., Schlesner, M. & Brors, B. circlize Implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics* **30**, 2811–2812 (2014).
52. Mitchell, A. L. et al. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Res.* **47**, D351–D360 (2018).
53. Katoh, K. & Standley, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 772–780 (2013).
54. Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M. & Barton, G. J. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189–1191 (2009).
55. Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A. & Minh, B. Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **32**, 268–274 (2015).
56. Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q. & Vinh, L. S. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 518–522 (2018).
57. Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A. & Jermini, L. S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods* **14**, 587–589 (2017).
58. Gotz, S. et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.* **36**, 3420–3435 (2008).

Acknowledgements

This study was supported by the LabEx “Who Am I?” #ANR-11-LABX-0071 and the Université de Paris IdEx #ANR-18-IDEX-0001 funded by the French Government through its “Investments for the Future” programme, the Agence Nationale de la Recherche (ANR PATHO-METHYLOME #ANR-15-CE12-0020), and the Plan Cancer “Épigénétique et cancer” 2015 (PARA-CAN #PARA-15-RCA). K.C. was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (#FRMSPF20140129419). J.B.W. is a senior member of the Institut Universitaire de France (IUF). We thank the UMR7216 Bioinformatics platform for computational support. We thank S. Ait-Si-Ali, L. Del Maestro and the UMR7216 Functional Epigenomics platform for advice. We thank the proteomics core facility at the Institut Jacques Monod for the LC–MS/MS experiments, the region Ile-de-France (SESAME), and the Université de Paris and CNRS for funding part of the LC–MS/MS equipment. We thank the technical platform “BioProfiler” (BFA, CNRS UMR 8251, Université de Paris) for providing the UFLC facilities. We thank members of the Weitzman laboratory, M.D. Weitzman and the UMR7216 for

discussions and critical reading of the manuscript. We thank G. Langsley (Institut Cochin, Paris, France) for the generous gift of TBL3, BL3 and TpMD409 cells, and K. Woods (University of Bern, Switzerland) for the gift of Tac12 cells. We thank J. Mellor (University of Oxford, UK) for the home-made H3K18me1 antibody. The KDM inhibitor (KDMi) and the KDAC inhibitor (KDACi) were generous gifts from A. Mai (Sapienza University, Rome, Italy) and M.A. Hakimi (IAB, Grenoble, France).

Author contributions

J.B.W. developed the conceptual framework, sought funding, wrote the manuscript and provided overall supervision. K.C., G.J., N.L., M.V., T.C.S., J.B., J.H., designed and performed experiments, analysed the data and helped write the paper. F.L. and F.R.L. provided supervision and expertise. K.C., G.J., N.L. and M.V. made equal contributions and are listed in alphabetical order.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23477-2>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.B.W.

Peer review information *Nature Communications* thanks Karine Le Roch and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

1 **SUPPLEMENTARY INFORMATION**

2

3

4 **TITLE**

5 **Dynamic methylation of histone H3K18 in differentiating *Theileria* parasites**

6

7 **Authors**

8

9 Kevin Cheeseman*¹, Guillaume Jannot*¹, Nelly Lourenço*¹, Marie Villares*¹, Jérémy Berthelet¹, Teresa
10 Calegari-Silva¹, Juliette Hamroune³, Franck Letourneur³, Fernando Rodrigues-Lima², Jonathan B.
11 Weitzman¹

12

13

14

15

16

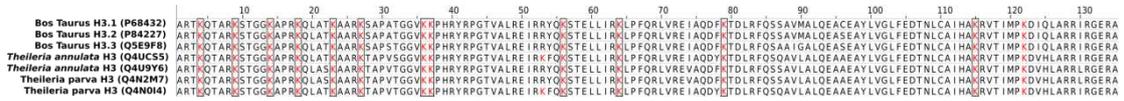
17 **Supplementary Data Figures 1-17**

18 **Supplementary Tables 1-5**

19

20

21



22

23

Supplementary Figure 1: Conserved histone sequences in cows and *Theileria* parasites.

Multiple alignments of the protein sequences of N-terminal tails of *Bos taurus* Histone H3.1, H3.2 and H3.3, together with the two histone H3 proteins in the *T. annulata* and *T. parva* genomes. Highly conserved lysine residues (K) are highlighted in red and the UniProt accession numbers indicated.

28

29

30

31

32

33

34

35

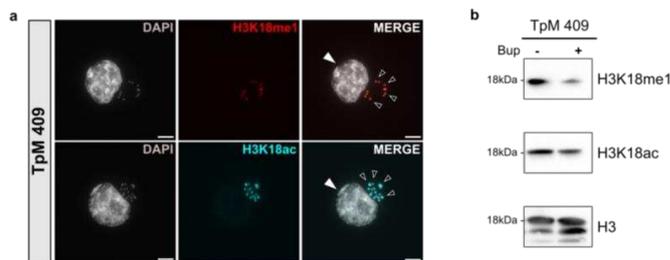
36

37

38

39

40



41

42

43

Supplementary Figure 2: Methylation of H3K18 in *T. parva* parasites.

- a. Immunofluorescence analysis of H3K18me1 (red) and H3K18ac (cyan) staining of TpM409 cells infected with *T. parva*. Host and parasite nuclei are stained with DAPI (grey). The solid white arrowheads indicate the host cell nucleus and empty white arrowheads point to the parasite nuclei. Leica microscope, 100X, Scale bar = 5µm.
- b. Western blot analysis of TpM409 cells treated with Buparvaquone (Bup), a theilericidal drug. H3 was used as a loading control.

All these experiments were performed three times independently with similar results; these data show one of these three times. Full scans of blots and immunofluorescence replicates are included in the Source Data file.

51

87

88

89

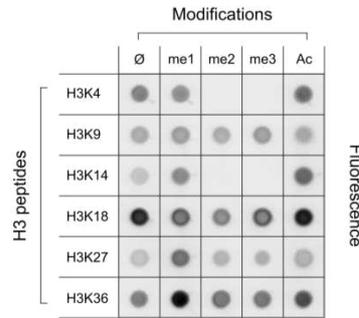
90

91

92

93

94



95

96

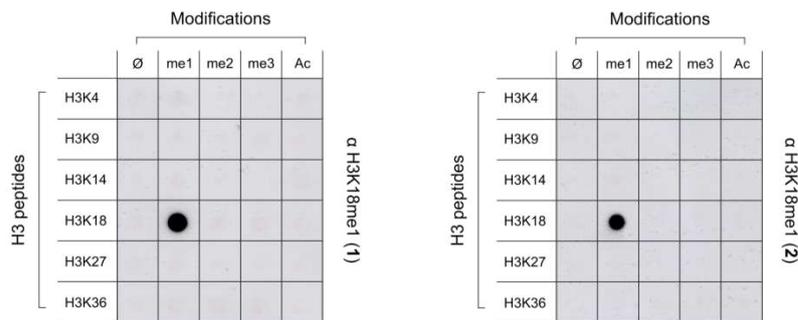
97

98

99

100

101



102

103

104

105

106

107

108

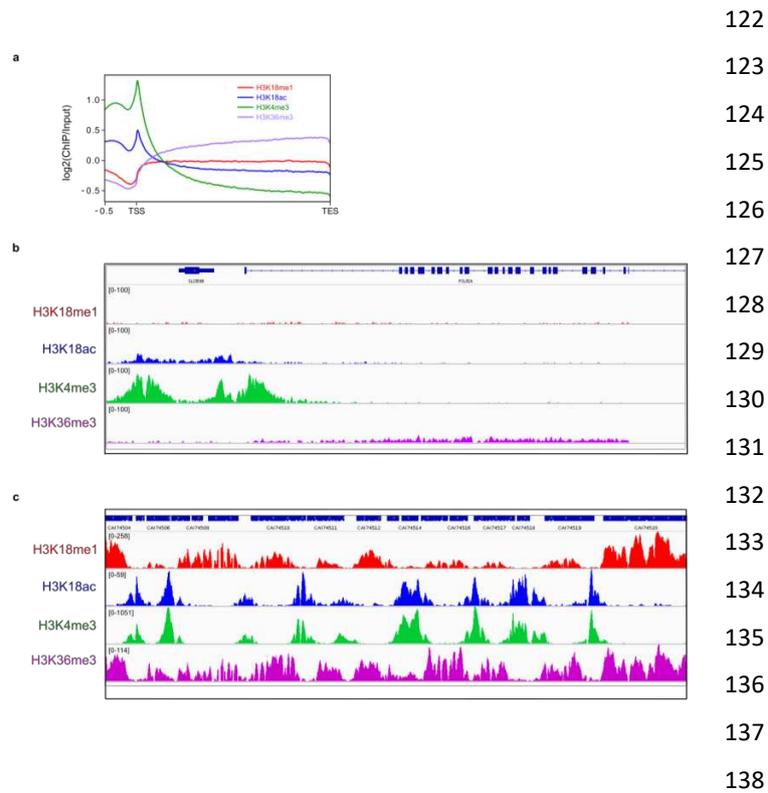
109

110

111

112 **Supplementary Figure 3: Characterization of antibody specificity using H3-derived modified**
 113 **peptides.**

114 Results of dot-blot analysis testing three independent antibodies recognizing mono-methylated H3K18
 115 against a range of peptide sequences. 2 µg of 5-FAM coupled short peptides flanking the unmodified,
 116 methylated or acetylated lysine of interest (namely H3K4: ARTKQTARRSK, H3K9: RQTARKSTGG, H3K14:
 117 STGGKAPRR, H3K18: RAPRKQLAT, H3K27: TKAARKSAPAT and H3K36: TGGVKRPHR) were transferred
 118 onto a nitrocellulose membrane and immunodetected using either antibodies against H3K18me1 (1:
 119 Abcam #ab177253, 2: Active Motif #31259, 3: a home-made antibody provided by Jane Mellor's
 120 laboratory) or H3K36me3 (Abcam #ab9050). Fluorescence of peptides was also detected as a dotting
 121 control.



139

140

141 **Supplementary Figure 4: H3K18me is not found on gene bodies on the bovine genome.**

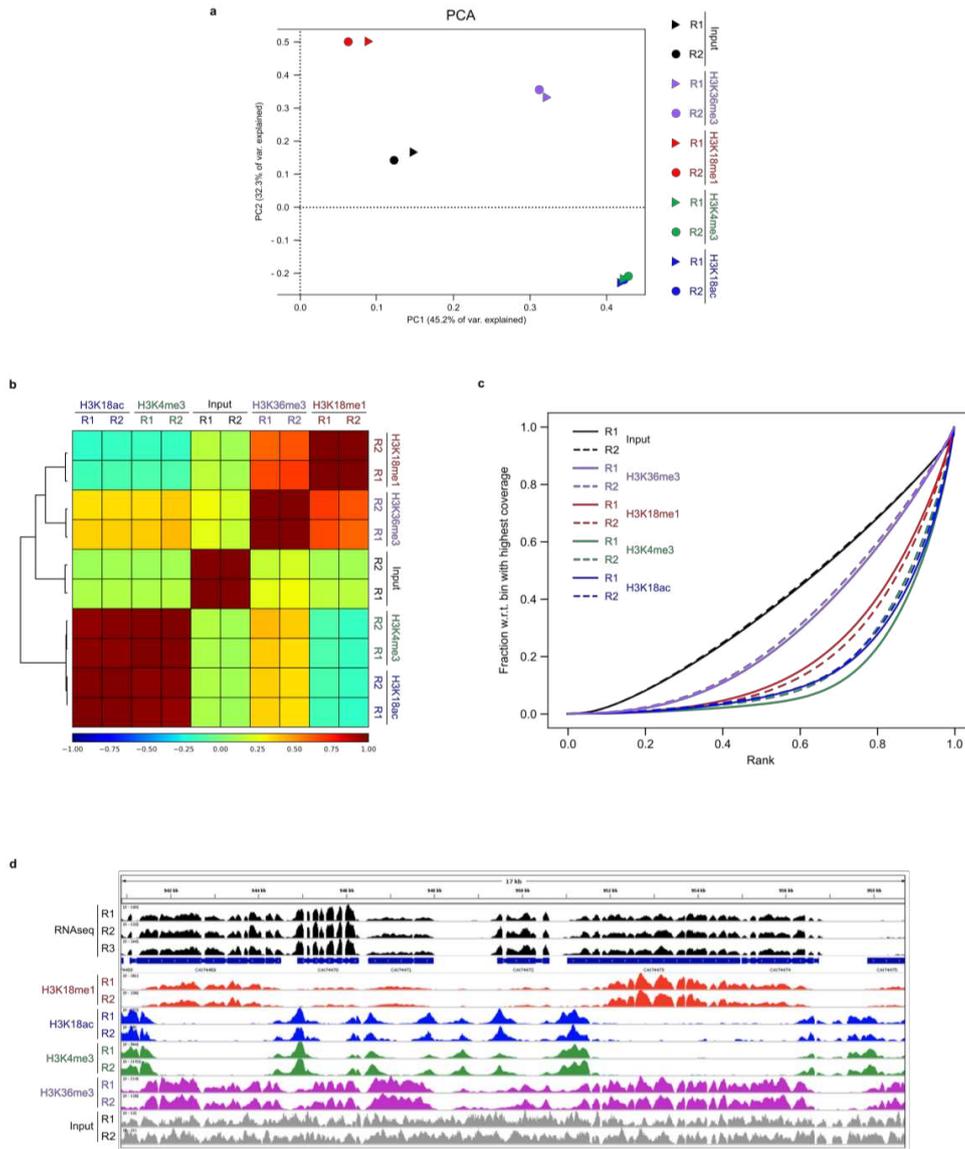
142 a. Average occupancy profiles for H3K4me3 (green), H3K18ac (blue), H3K18me1 (red) and
 143 H3K36me3 (purple) around the transcriptional start site (TSS) of all *Bos taurus* genes. X-axis:
 144 genome coordinates starting from 500 bp before the TSS to the TES. Y-Axis: log₂ (ChIP/Input).
 145 H3K4me3 and H3K18ac profiles display enrichment around the TSS region, whereas
 146 H3K36me3 is depleted at the TSS and shows an enrichment over the gene bodies. H3K18me1
 147 is not enriched on the bovine genome.

148 b. Chromatin ChIP-Seq profiles over a 25 kb-long representative region of the *Bos taurus*
 149 genome. Top track: Annotations, H3K18me1 (red), H3K18ac (blue), H3K4me3 (green), and
 150 H3K36me3 (purple).

151 c. Chromatin ChIP-Seq profiles over a 25 kb-long representative region of the *T. annulata*
 152 genome. Annotations, H3K18me1 (red), H3K18ac (blue), H3K4me3 (green), and H3K36me3
 153 (purple).

154

155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194



Supplementary Figure 5: Spearman correlation plot of ChIP-Seq data on the parasite genome.

- a. Graph of the Principal component analysis (PCA) for the various ChIP duplicate samples demonstrating good correlation between replicates.
- b. Clustered Heatmap of H3K18me1, H3K18ac and H3K4me3 and H3K36me3 Spearman correlation coefficients for read mapping from the ChIP-Seq analysis of the parasite genome. Clustering was performed using the nearest point algorithm.
- c. Results of the deepTools plotFingerprint analysis to evaluate ChIP enrichment.
- d. Genome browser tracks depicting epigenetic profiles in replicate samples (these data are merged in the presentation in Figure 2e). RNaseq (three replicas, black), H3K18me1 (red), H3K18ac (blue), H3K4me3 (green), H3K36me3 (purple) and Input (grey).

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242 **Supplementary Figure 6: Circular chromosomal representation of ChIP-seq and gene expression.**

243 Representation of the four chromosomes (chr. 1-4) of the *T. annulata* genome: each circular track

244 showing (from the innermost track): H3K36me3 (purple), H3K4me3 (green), H3K18ac (blue) and

245 H3K18me1 (red) ChIPseq data, the last two tracks show log₁₀(RPKM) gene expression values for genes

246 belonging to cluster IV (light grey background) or to clusters I, II, III & V.

247

248

249

250

251

252

253

254

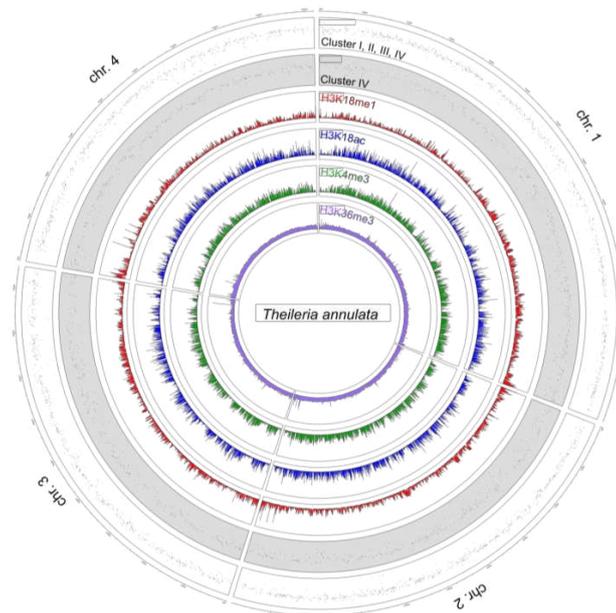
255

256

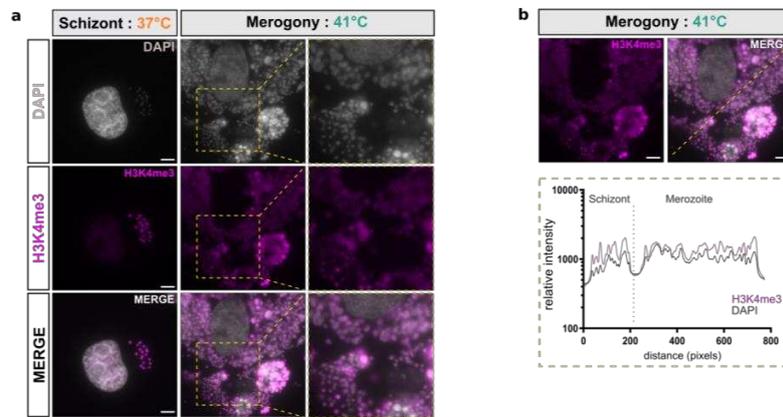
257

258

259



260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294



Supplementary Figure 7: H3K4me3 staining upon merogony.

- a. Immunofluorescence analysis of TaC12 infected macrophages cultured at 37°C (left) or following merogony induction for 8 days at 41°C (right). Host and parasite nuclei are stained with DAPI (grey) or a specific antibody against H3K4me3 (magenta). Leica microscope, 100X, Scale bar = 5µm.
- b. Quantification of immunofluorescence intensity of H3K4me3 (magenta) compared to DNA (grey) showing constant staining across all parasites. The plot profiles represent the yellow line cross-section.
- All these experiments were performed three times independently with similar results; these data show a representative example of these three times.

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

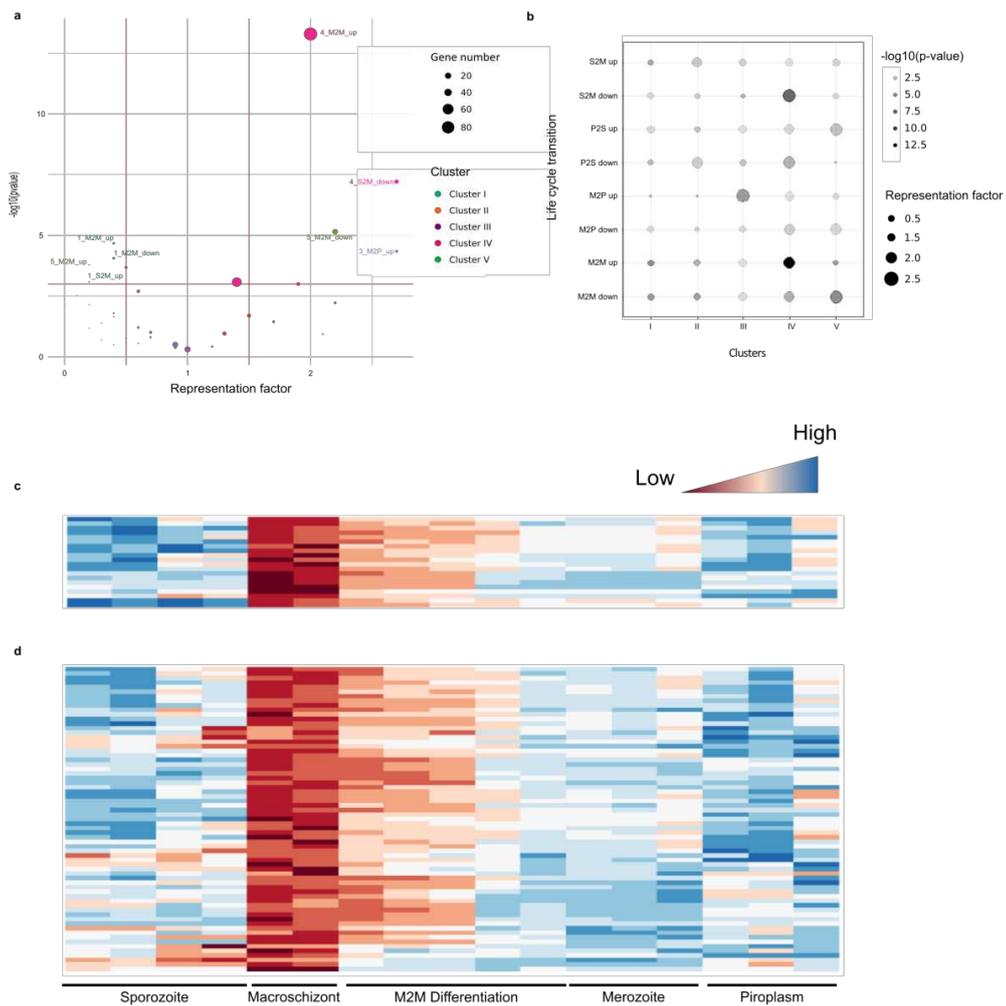
318

319

320

321 **Supplementary Figure 8: Analysis of differentially expressed genes across the parasite life cycle.**

- 322 a. Chart showing the representation factor as a function of p-value for each life cycle transition
 323 as reported by Pieszko *et al.* Dot size is defined by gene number, and colours indicate genes
 324 from the different clusters. The vertical red lines indicate representation factors of 0.5 or 1.5
 325 and the horizontal red line indicates a p-value of 0.001. Only groups with a p-value < 0.001 and
 326 a representation factor >1.5 or <0.5 are labelled. Labels: M2M_up and M2M_down,
 327 macroschizont to merozoite upregulated or down-regulated genes; S2M_up and S2M_down,
 328 sporozoite to macroschizont upregulated or down-regulated genes; M2P_up, merozoite to



- 329 piroplasm up-regulated genes; and P2S_down, piroplasm to sporozoite down-regulated
330 genes. Notably, the M2M and S2M dots corresponding to Cluster IV are highly significant.
- 331 b. Dot chart of representation factors and p-values of overlap between differentially expressed
332 genes in the transition to different life cycle stages derived from a published microarray
333 (Pieszko et al.) and presently derived clusters. Dot transparency is plotted as p-value and dot
334 size displays the representation factor: S2M_up and S2M_down, sporozoite to macroschizont
335 up-regulated or downregulated genes; P2S_up and P2S_down, piroplasm to sporozoite up-
336 regulated or downregulated genes; M2P_up and M2P_down, merozoite to piroplasm up-
337 regulated or down-regulated genes; and M2M_up and M2M_down, macroschizont to
338 merozoite up-regulated or down-regulated genes.
- 339 c. Analysis of gene expression profiles in differentiating parasites and correlation with cluster IV.
340 Investigation of the parasite genes belonging to cluster IV over the course of the life-cycle
341 (sporozoite>macroschizont->differentiation to merozoite -> merozoite->piroplasm) using the
342 microarray data from Pieszko *et al.* (2015). Heatmap analysis of the 20 genes that overlap in
343 the S2M-down:M2Mup: cluster IV subgroup (listed in Table 1).
- 344 d. Heatmap analysis of the 67 parasite genes from in the M2M-up: cluster IV subset (listed in
345 Table 2). Heatmap scale based on z-score of expression values from series GSE71307
346 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE71307>), and coloured from red to
347 blue (low expression to high expression).
- 348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

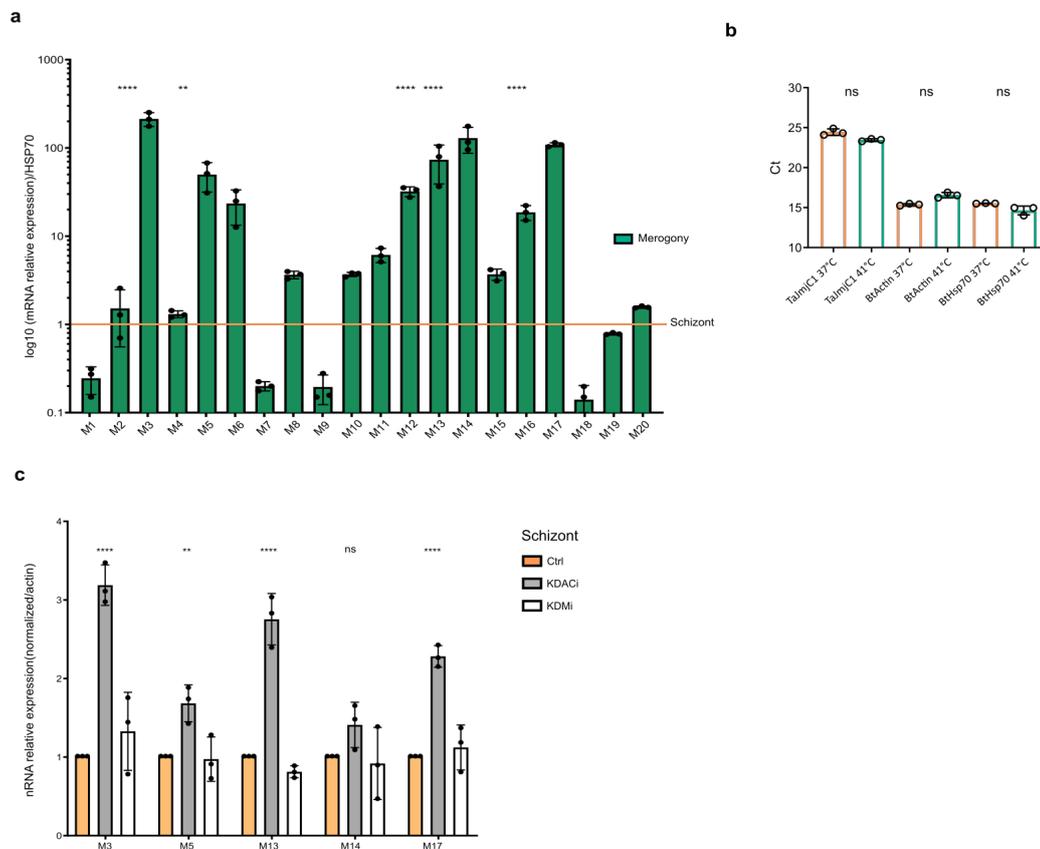
384 **Supplementary Figure 9: Expression of potential stage-associated Cluster IV genes.**

385 a. Expression analysis (RT-qPCR) of the 20 identified *M2M* genes (listed in Supplementary Table
 386 1) in infected TaC12 macrophages, before and after merogony induction culture conditions.
 387 The orange line indicates the relative gene expression in cells grown at 37°C (macroschizont
 388 stage). The results represent the mean of expression results from three independent
 389 experiments. 15 of the *M2M* genes increased in expression upon merogony. Error bars
 390 represent the mean values +/- SD. ns $p > 0.99$; * $p = 0.0249$; **** $p < 0.0001$.

391 b. Expression analysis (RT-qPCR) of control genes (parasite, Ta or bovine, Bt) that do not show
 392 changes in expression upon induction of merogony.

393 c. Expression analysis (RT-qPCR) of selected *M2M* genes following treatment of TaC12 infected
 394 macrophages with epigenetic inhibitors KDACi (grey bars) or KDMi (white bars). Results are
 395 shown as the mean values +/- SD for three independent experiments with ns $p > 0.2310$; **
 396 $p = 0.0052$; **** $p < 0.0001$.

397 For all experiments $n = 3$, Statistical Dunnett's multiple comparison test, two-sided: ns = not
 398 statistically significant; **** $p < 0.0001$; ** $p < 0.005$.



399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409 **Supplementary Figure 10: Schematic representation of SET domain proteins (TaSETup1-5) and**
 410 **potential demethylases (TaJmjC1-2)**

411 a. Schematic representation of the five putative lysine methyltransferases (listed in
 412 Supplementary Table 4) and the two potential demethylases, indicating the presence of the
 413 putative catalytic SET domain and other domains, Jumonji domains (JmjC and JmjN), Bromo
 414 domain, AWS (Associated With SET) domain, and a post-SET domain.

415 b. Expression analysis (RT-qPCR) of the two parasite putative demethylases in cells grown at 37°C
 416 (schizont stage) or at 41°C (merogony). The results represent the mean values +/- SD for three
 417 independent experiments. Statistical Dunnett's multiple comparison test, two-sided: ns=not
 418 statistically significant $p > 0.9876$; $*p < 0.0461$

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

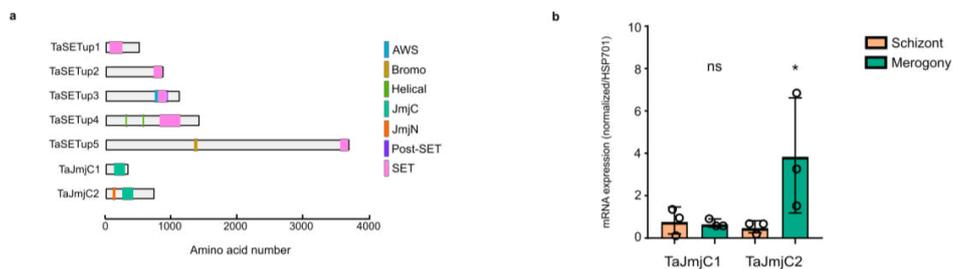
429

430

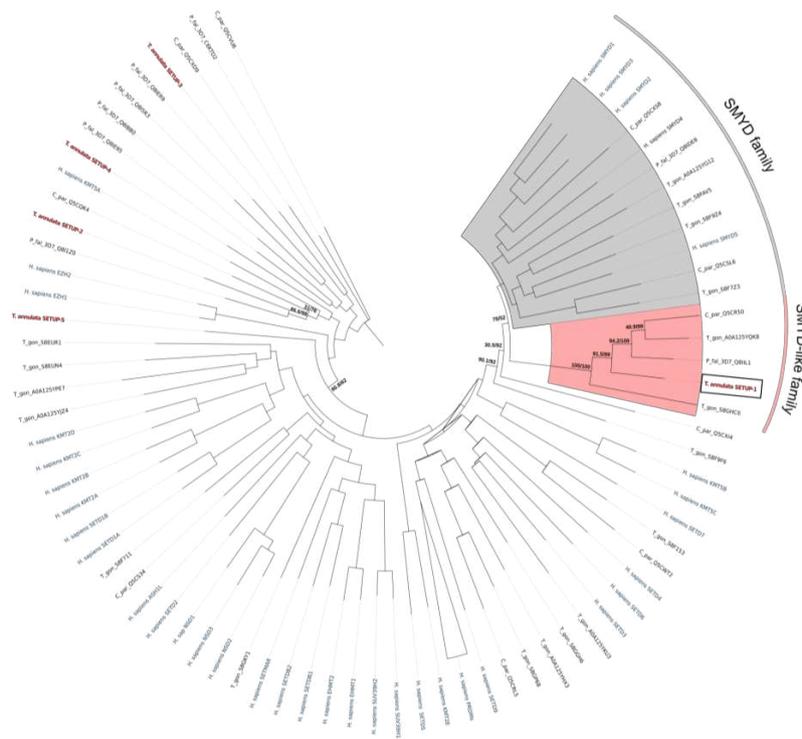
431

432

433



434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453



454 **Supplementary Figure 11: Phylogenetic analysis of genes encoding *Theileria* SETup proteins**

455 The tree is constructed with *Homo sapiens* KMT proteins (light blue with their generic names), *T.*
456 *annulata* TaSETup proteins (red) and other apicomplexan proteins (black) with the species name first
457 followed by their InterPro accession number. P_fal_3D7: *Plasmodium falciparum* 3D7, C_par :
458 *Cryptosporidium parvum*, T_gon : *Toxoplasma gondii*. The SMYD (SET and MYND domain family) and
459 SMYD-like orthologs are shown in grey and red boxes, respectively. Branch support values displaying
460 branch support for the Ta-SETup proteins are indicated in the form ultra-fast bootstrap/alrt-sh like
461 bootstrap values and were computed using iqtree software version 1.65.

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482 **Supplementary Figure 12: Assays of methyltransferase activity *in vitro* for TaSETup1**

483 a. Methyltransferase assay of recombinant TaSETup1 (wild-type WT or mutant H206F)
 484 incubated, with or without SAM and recombinant Histone H3, followed by immuno-dot-blot
 485 detection with a H3K18me1 antibody. Results were normalized to histone H3.

486 b. As above, methyltransferase assay of recombinant TaSETup1 (wild-type WT or mutant H206F)
 487 using histone H3 from calf thymus as the substrate.

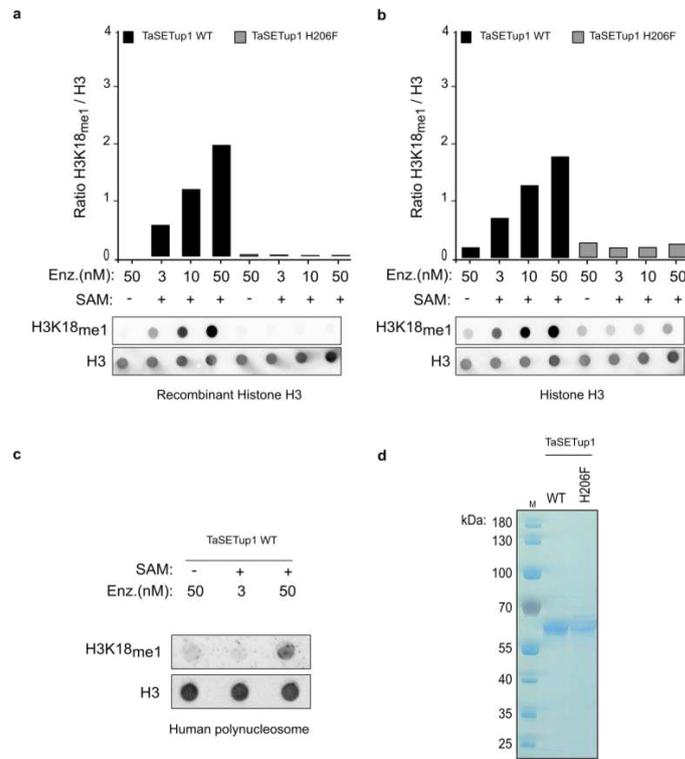
488 c. Methyltransferase assay of recombinant TaSETup1 wild-type incubated with or without SAM
 489 and human polynucleosomes purified from HeLa cells (EpiCypher) followed by immuno-dot-
 490 blot detection with the H3K18me1 antibody.

491 d. Coomassie staining of recombinant TaSETup1 wild-type WT or mutant H206F.

492 All these experiments were performed three times independently with similar results; these data
 493 shown represent one of these three experiments.

494

495



496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

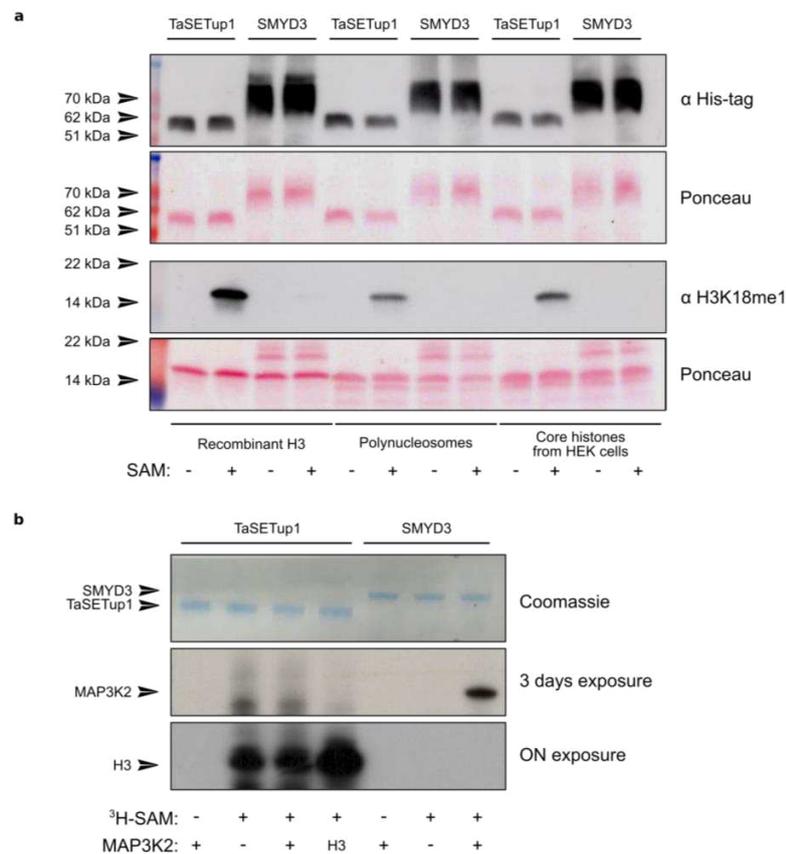
514

515

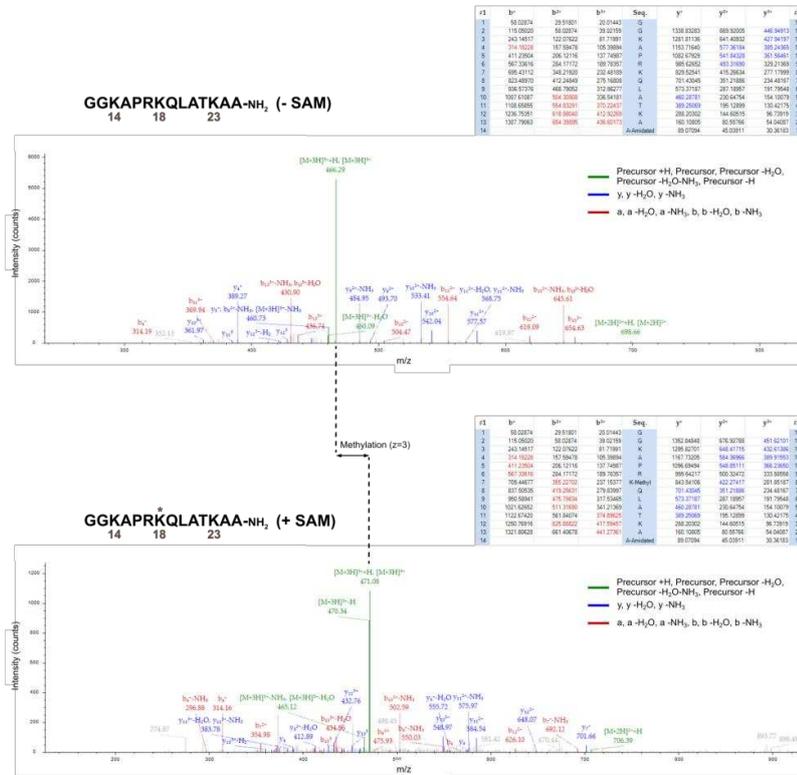
516 **Supplementary Figure 13: Comparison of TaSETup1 and SMYD3 methyltransferase activity on**
 517 **different substrates**

- 518 a. Methyltransferase assay of recombinant TaSETup1 or SMYD3 enzymes with recombinant
 519 histone H3, chicken polynucleosomes and core histones substrates extracted from HEK cells.
 520 1 µg of enzyme was incubated with or without SAM and with histone substrates at 30°C
 521 overnight. Samples were then separated by SDS-PAGE followed by immuno-blot detection
 522 with an H3K18me1 antibody.
- 523 b. Radiometric methyltransferase assay of recombinant TaSETup1 or SMYD3 proteins with
 524 recombinant MAP3K2 or histone H3 substrates. 1 µg of enzyme was incubated with or without
 525 ³H-SAM and with recombinant MAP3K2 or H3 substrate at 30°C overnight. Samples were
 526 separated by SDS-PAGE and gel was Coomassie stained. Incorporation of the ³H-methyl group
 527 was detected as an autoradiographic signal at different time points.

528 All these experiments were performed three times independently with similar results; a representative
 529 of the three experiments is shown.



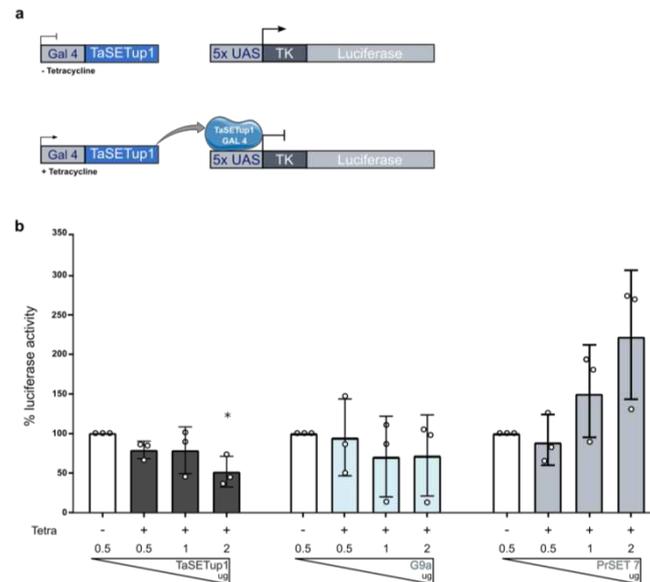
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564



Supplementary Figure 14: Mass spectrometry characterization of H3K18 monomethylation by TaSETup1.

50 µg of a H3 derived 14-mer peptide flanking the lysine 18 were incubated with 3 µg TaSETup1 and with or without SAM for 2h at room temperature. Samples were analysed by LC-MS/MS as described in Methods. Upper panel shows the spectrum obtained in the sample without SAM, while the bottom panel displays the data obtained in the presence of SAM. The position of methylation is indicated on the H3K18 peptide sequence by an asterisk (*).

565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599



Supplementary Figure 15: Luciferase assay of TaSETup1 activity.

a. Schematic representation of 5X GAL4-UASTK-Luc reporter system, stably integrated in HEK293 cells (T-REx system). Cells were stably transfected with GAL4-TaSETup1 and grown in the presence or absence tetracycline for 48 h.

b. Repression of Luciferase expression with increasing amounts of GAL4-TaSETup1 compared to GAL4-G9a (known repressive KMT) or GAL4-PrSET7 (known activating KMT) in the presence or absence of tetracycline. Data are represented as percent of uninduced controls (mean ± SEM, n = 3).

Statistical Dunnett’s multiple comparison test, two-sided: ns=not statistically significant p>0,3976;

*p<0.0299

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615 **Supplementary Figure 16: Merogony is associated with reduced TaSETup1 and reduced H3K18me1.**

616 a. Flow cytometry (FACS) analysis of *Tac12* infected macrophage cells grown at 37°C (schizont stage, left panel) or incubated at 41°C (merogony stage, right panel). Live cells labeled with antibodies against H3K18me1 (mCherry) and sorted by forward scatter and mCherry intensity levels.

620 b. The two populations of cells (H3K18me1-hi and H3K18me1-lo) were analysed by RT-qPCR for the expression of the parasite *TamR1* gene (an indicator of merozoite differentiation) or *TaSETup1* (the schizont-expressed parasite KMT). The H3K18me1-lo population was enriched for the *TamR1* differentiation marker and showed reduced *TaSETup1* expression. The graph shows the mean + SD for technical triplicates, n=3.

625 c. Western blot analysis of the two sorted cell populations with an antibody specific to H3K18me1. Immunoblotting for histone H3 was used as control. This experiment has been done in technical replicate n=3.

628

629

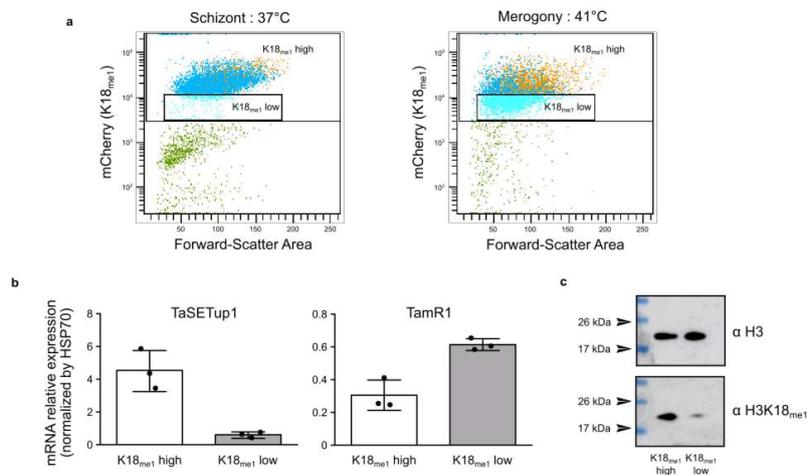
630

631

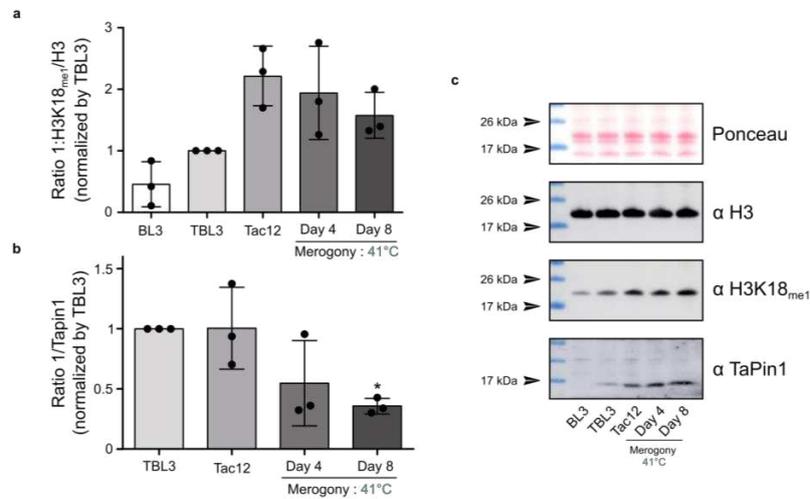
632

633

634



635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667



Supplementary Figure 17: Immunoblot analysis of cells undergoing merogony.

- Graphical representation of the H3K18me1: Histone H3 ratio (the levels in TBL3 infected cells were set at 1) comparing BL3 and TBL3 cells, or TaC12 macrophages (in the schizont stage or at 2 merogony stages, day 4 or 8).
- Graphic representation of the H3K18me1: Histone H3 ratio normalized for expression of TaPin1.
- Western blot analysis of H3, H3K18me1 and the parasite Tapin1 protein in BL3, TBL3, or Tac12 cells (in the schizont stage or at 2 merogony stages, day 4 or 8)

These experiments were performed three times independently with similar results; these data show one of these three experiments. Full scans blots are included in the Source Data file.

668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702

Name	gene ID	Original annotation	Re-annotation (blast2go)	InterPro IDs
M2M1	TA21400	hypothetical protein	Tpr-related protein family member	no JFS match
M2M2	TA19775	hypothetical protein	hypothetical protein TA19775	IPR007480 (OUF529); SignalP
M2M3	TA05870	rhogry-associated protein	rhogry-associated protein	IPR004318 (Rhogry-associated protein 1); SignalP
M2M4	TA17055	hypothetical protein	hypothetical protein TA17055	SignalP
M2M5	TA21080	Map2 kinase, putative	putative cell-cycle-associated protein kinase MAPK	IPR000719 (Protein kinase domain)
M2M6	TA18005	hypothetical protein	hypothetical protein TA18005	IPR027242 (serine aminopeptidase, S33); IPR007480 (OUF529); IPR029058 (alpha/beta hydrolase fold)
M2M7	TA07305	hypothetical protein	hypothetical protein TA07305	no JFS match
M2M8	TA14210	hypothetical protein	methane protein	SignalP; TrnHeliK
M2M9	TA39875	hypothetical protein	A1 hook motif-containing protein	no JFS match
M2M10	TA07435	SflI-subtelomeric fragment	SflI-subtelomeric fragment related protein family member	IPR007480 (OUF529)
M2M11	TA14205	hypothetical protein	SflI-subtelomeric fragment related protein family member	SignalP
M2M12	TA16155	hypothetical protein	DNA topoisomerase VI, b subunit	IPR016890 (Histidine kinase/HSP90-like ATPase)
M2M13	TA16660	hypothetical protein	rhogry neck protein 5	TrnHeliK
M2M14	TA13045	hypothetical protein	putative duplicated carbonic anhydrase	IPR001148 (Alpha carbonic anhydrase domain); SignalP
M2M15	TA16420	hypothetical protein	hypothetical protein TA16420	SignalP
M2M16	TA03755	sporozoite surface antigen	sporozoite surface protein p67	IPR008845 (Sporozoite p67 surface antigen); SignalP; TrnHeliK
M2M17	TA08360	hypothetical protein	protein 82	IPR007480 (OUF529); SignalP
M2M18	TA21395	hypothetical protein	Tpr-related protein family member	TrnHeliK
M2M19	TA04795	hypothetical protein	Tpr-related protein family member	SignalP
M2M20	TA04825	hypothetical protein	Tpr-related protein family member	SignalP; TrnHeliK

Supplementary Table 1: 20 Cluster IV genes associated with life cycle transitions.

Original annotation (and functional re-annotation) of the 20 Cluster IV genes (i.e. enriched H3K18me1) that we identified as potentially up-regulated in macroschizont to merozoite transition (M2M), downregulated in sporozoite to macroschizont transition (S2M). The table shows the *Theileria* gene IDs, re-annotation derived from Blast2GO, official annotation available at PiroplasmaDB and domain content of the 20 genes (see Fig. 4b).

703

704

705

Gene ID	original annotat on	Re-annotat on (Blast2Go)	InterPro IDs
TA15445	hypothet cal protein	Tpr-related protein family member	Tmhelix
TA19610	<i>Theileria</i> -specif c hypot het cal telomeric sf I fragment-related protein	diacylglycerol O-acyltransferase	no IPS match
TA21205	hypothet cal protein	hypothet cal protein TA21205	SignalP
TA04355	hypothet cal protein	serine/threonine kinase	no IPS match
TA18855	Tpr-related protein family member	SF I-subtelomeric fragment related protein family member	DUF529 (IPR007480); SignalP
TA09000	cysteine proteinase	Tpr-related protein family member	Tmhelix
TA09130	hypothet cal protein	alpha/beta hydrolase	no IPS match
TA17491	hypothet cal protein	SF I-subtelomeric fragment related protein family member	no IPS match
TA17325	Tpr-related protein family member	integral membrane protein	Tmhelix
TA17115	Tpr-related protein family member	SF I-subtelomeric fragment related protein family member	IPR007480; SignalP
TA08525	hypothet cal protein	inner membrane complex protein 1e	IPR021095
TA17100	hypothet cal protein	hypothet cal protein TA17100	no IPS match
TA07025	Tpr-related protein family member	Tpr-related protein family member	Tmhelix
TA20150	hypothet cal protein	Tpr-related protein family member	Tmhelix
TA14310	hypothet cal protein	ubiquitin-protein ligase	SignalP
TA07162	hypothet cal protein	hypothet cal protein TA07162	SignalP
TA19445	hypothet cal protein	phosphorylation domain 2	Tmhelix
TA14605	hypothet cal protein	Class II myosin heavy chain	SignalP; Tmhelix
TA18780	hypothet cal protein	integrin beta-1 like isoform x2	no IPS match
TA05245	hypothet cal protein	Tpr-related protein family member	Tmhelix
TA07920	Tpr-related protein family member	hypothet cal protein TA07920	no IPS match
TA21385	ubiquitin-conjugating enzyme E2	Tpr-related protein family member	no IPS match
TA11840	hypothet cal membrane protein	Tpr-related protein family member	Tmhelix
TA21390	hypothet cal protein	Tpr-related protein family member	Tmhelix
TA21380	phosphate transporter	Tpr-related protein family member	no IPS match
TA10050	hypothet cal protein	SF I-subtelomeric fragment related protein family member	IPR007480; SignalP
TA11680	hypothet cal protein	perforin-like protein (pl1)	IPR020864; SignalP
TA16485	hypothet cal protein	transcript on factor with AP2 domain-containing protein	IPR028078; IPR001471
TA05615	Tpr-related protein family member	hypothet cal protein TA05615	SignalP
TA09115	SF I-subtelomeric fragment related protein family member	membrane protein	Tmhelix
TA07985	hypothet cal protein	hypothet cal product	IPR036259; Tmhelix
TA10690	hypothet cal protein	ubiquitin-conjugating enzyme subfamily protein	IPR006068; IPR016135
TA13540	hypothet cal protein	cyclic nucleotide-binding domain containing protein	IPR000595; IPR018490; IPR018490; IPR011992
TA21050	hypothet cal protein	beta receptor G222 isoform X1	Tmhelix
TA18600	hypothet cal protein	integral membrane protein	Tmhelix
TA18275	Tpr-related protein family member	early endosome ant gen 1	no IPS match
TA03521	Tpr-related protein family member	SF I-subtelomeric fragment related protein family member	IPR007480
TA14955	hypothet cal protein	signal pept ide containing protein	IPR007480; SignalP
TA17358	Tpr-related protein family member	SF I-subtelomeric fragment related protein family member	IPR007480
TA00020	SF I-subtelomeric fragment related protein family member	putat ve anonymous ant gen-1	IPR016024
TA13980	hypothet cal protein	putat ve transmembrane protein	no IPS match
TA21375	hypothet cal protein	Tpr-related protein family member	no IPS match
TA17490	SF I-subtelomeric fragment related protein family member	SF I-subtelomeric fragment related protein family member	no IPS match
TA13530	integral membrane protein	phosphate transporter	IPR001204; Tmhelix
TA13935	<i>Theileria</i> -specif c hypot het cal telomeric sf I fragment-related protein	cyclic nucleotide-binding domain containing protein	IPR018675
TA04105	SF I-fragment related sub-telomeric hypot het cal protein family member	signal SV aminoacylase 2	IPR000608; IPR014882; SignalP; IPR036496; IPR038765
TA07585	SF I-fragment related sub-telomeric hypot het cal protein family member	CTD nuclear envelope phosphatase 1	Tmhelix
TA21370	SF I-subtelomeric fragment related protein family member	putat ve transmembrane protein	IPR021366; Tmhelix
TA13515	aspartyl/glutamate proteinase	transcript on factor with AP2 domain(s)	IPR001471
TA15500	hypothet cal protein	Tpr-related protein family member	Tmhelix
TA17685	hypothet cal protein	plasmepsin V	IPR031121; IPR021109
TA03855	hypothet cal protein	Tpr-related protein family member	Tmhelix
TA02300	SF I-subtelomeric fragment related protein family member	hypothet cal protein TA02300	IPR007480; SignalP
TA19115	hypothet cal protein	SF I-subtelomeric fragment related protein family member	IPR007480
TA14680	SF I-subtelomeric fragment related protein family member	hypothet cal protein TA14680	SignalP; Tmhelix
TA06795	hypothet cal protein	Flamm/ABP280 repeat-containing protein	IPR017868; IPR014756
TA04790	hypothet cal protein	Tpr-related protein family member	Tmhelix
TA03540	hypothet cal protein	hypothet cal protein TA03540	SignalP
TA15485	<i>Theileria</i> -specif c hypot het cal protein	Tpr-related protein family member	Tmhelix
TA14120	hypothet cal protein	Tpr-related protein family member	no IPS match
TA20030	hypothet cal protein	280 kDa ant gen r200	no IPS match
TA07955	hypothet cal protein	hypothet cal protein TA07955	no IPS match
TA15095	hypothet cal protein	Tpr-related protein family member	no IPS match
TA14285	hypothet cal protein	SF I-subtelomeric fragment related protein family member	IPR007480; SignalP
TA14835	hypothet cal protein	hypothet cal protein TA14835	no IPS match
TA17500	hypothet cal protein	SF I-subtelomeric fragment related protein family member	no IPS match
TA03845	<i>Theileria parva</i> Tpr-related protein	Tpr-related protein family member	Tmhelix

722

723

724

725 **Supplementary Table 2: 67 Cluster IV genes associated with M2M transitions.**

726 Original annotation (and functional re-annotation) of the 67 M2M_Cluster IV genes potentially up
 727 regulated in macroschizont to merozoite transition (M2M). The table shows the *Theileria* gene IDs, re-
 728 annotation derived from Blast2GO, official annotation available at PiroplasmaDB and domain content
 729 of the 67 genes (see Fig. 4b).

730

731

732

733

734

735

736

737

738

739

Gene ID	Protein ID	cluster	Description
TA18095	Q4UB32	1	
TA02615	Q4UD26	1	
TA16105	Q4UIG3	1	
TA16535	Q4UIY2	1	
TA17415	Q4UAU9	2	
TA12015	Q4UDT1	2	TaAP2.me2
TA09965	Q4U8Q5	3	
TA07550	Q4UA38	3	
TA04145	Q4UCX3	3	
TA11665	Q4UDL7	3	
TA20595	Q4UH38	3	
TA11145	Q4U8H9	4	TaAP2.me1
TA10940	Q4U982	4	
TA08375	Q4U9N8	4	
TA07100	Q4UAC2	4	
TA05055	Q4UBQ3	4	
TA13515	Q4UEK3	4	TaAP2.g
TA19920	Q4UG29	4	
TA06995	Q4UHX0	4	
TA16485	Q4UIX2	4	TaAP2.me3

750

751

752

753

Supplementary Table 3: List of *Theileria* ApiAP2 genes and their H3K18me1 status (cluster).

754

Table showing the GeneID, uniprotID and the cluster assignment for all the 20 *Theileria* ApiAP2 genes.

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807

Name	UniProt/Interpro	pfrioplasmadb	ensembl	Gene_id	refseq_prot	refseq_mrna	Cluster #	gene size (nt)	# exons	prot size (aa)	mass (kDa)
TaSETup1	Q4UHT5	TA06820	CAI7354	3863755	XP_954031	XM_948938	II	1473	8	490	56.8
TaSETup2	Q4UGM0	TA21435	CAI3769	3863445	XP_954446	XM_949353	III	2532	7	843	97
TaSETup3	Q4UBN4	TA09850	CAI76819	3863308	XP_953444	XM_948351	IV	3252	2	1083	122.4
TaSETup4	Q4UBM9	TA05190	CAI75772	3864564	XP8955248	XM_950155	IV	4128	4	1375	159.5
TaSETup5	Q4UBP1	TA09890	CAI76812	3863102	XP_953439	XM_948344	IV	10788	9	3595	415.4
KDM1	Q4UG30	TA19925	CAI73959	3864155	XP_954636	XM_949543	III	2624	12	709	81.7
KDM2	Q4UEH4	TA13355	CAI74515	3861560	XP_952247	XM_947154	II	1181	5	324	37.1

Supplementary Table 4: List of *Theileria* SET-domain containing genes (*TaSETup* genes).

Table showing the gene references, cluster allocation and predicted protein size for the five SETup protein methyltransferases in the *T.annulata* genome (see Supplementary Fig. S10).

808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838

Target genes	Forward	Reverse
Cloning		
Gal4_SerB_Smal_F / NotI_R	ATCCCGGGGATGTACATTAATGCGAATGAAGAAACG	TGGAGCGGCCCTCATGTTTATCATGAGGTGATTTCT
TaSET-B Gateway	BBBpacaatttggacaanaaahgttggcagTACAAATAATGCGAATGAAGAA	BBBpacaatttggacaanaaahgttggcagTATGCTTATCATGAGGTGATTTCTAC
TaSET-B H206f	CCTCATGCTGTGGCATCACAC	GGTTACAGCTAAAGGGGACATAGG
qPCR		
TamR1	CCACTCTGTAGCGGGTAAA	TTGTGGAGGTACTGACCCAAA
HSP70	ACGCCAAATGGAAATCTTCAAC	TATTGGTGTGCTCTGCTAA
TaSETup4	TGGGAACCTATCACCCGGAC	GTCCGCAACCAACAGCAAT
TaSETup5	ATCGAGACTTACGACGTGCC	ATGCTGTGCACAGCTTACT
TaSETup3	TTGTCCGGGGCAAGATTGAGT	GTGGAAAAGCCCGAGATAGC
TaSETup2	AAGTGAAGCACACCCGATGTT	TGTACGGCTCAACTCCGAC
TaSETup1	GATATTGGCAGAAATGCCCGC	TGGTTTCGTTTTCCACC
HDM1_TA19925	AGCGGACCTCAACGCTTTTT	TGAGCAGTGAACCCATCACAC
HDM2_TA13355	TACGGCAATGAAGACCCACG	CCGCTTCTGGAGATGAACCG
M1_TA21400	ACTAAGGGCTGGTAATGTGC	TGGAGCTTTGTGTAGGCTT
M2_TA19275	AAGCCGGGAGACACATACAGT	CCGGCATTTGTAGGGGTTT
M3_TA08870	TGGTCCAGGTTAAGTGTTCGG	GGCTAGCGAGCACCAAGTATG
M4_TA17055	GCATCGTTTGTGACTGGC	TAGTCTTTGGCAGCATGTC
M5_TA21080	GCACITGGAACTGGGTGCAAAA	TAGGACCTTGAAGCAACCAT
M6_TA18005	CAATGTCCGATGTGAACGGG	GATCGGATTCACATTTGGGA
M7_TA07305	TGAGAGTGCATGAGAGGAG	ACTGTTCACAAAGGCTCA
M8_TA14210	TGGGCAAGATGGGAATGGTGC	ATCTATGGCAACTCTGGG
M9_TA19675	GGCAGAACMAAGGGTTAGGGA	CTCTGAGGGATCATCATCT
M10_TA07435	AAAGAAAGGGCCGATACCGTT	TGGAAACCATTTGACCAGTT
M11_TA14205	CGAGACTGTTTCCGGTAAA	TCATCCACAGTTTGGCAGT
M12_TA16155	TGCCAATTGACCGCATGGCAAGA	CCCGACCACCATGTAAMAAC
M13_TA16660	GGCCGTGTCTAGATGAGCA	CCCTCCITGGGGCATAGAT
M14_TA13045	TGGCATGTGAGTGTCTGGATT	ACCATGCTCCCTGTTTCCA
M15_TA16420	TCCGCATGTGAAAGCAATATCT	CTCGAACCTCCCGGTAAGTTGT
M16_TA03755	GGAGGATTCAGTAAGGGGGCA	TGAGGGGTCTGAGGGTACAT
M17_TA08360	ATTTTTCAAAAGCGGGTGGCG	CGTGCTTTCGTCTCAACA
M18_TA21395	GGTAAACACATCCGATGGGGG	AGCCATGATGGTGGCCAGTTA
M19_TA04795	CCAACGGCACCTTAAGTGGT	TGACCAAGTGCATCATGAG
M20_TA04825	GCTAAAAAAGGAGGTGTGGGG	TCCTTACTTGGTTCACCCG

Supplementary Table 5: List of oligonucleotides used in this study for cloning, qPCR analysis or ChIP-PCR experiments.

I- 3) Discussion additionnelle

Cette étude montre que les changements dynamiques des marques épigénétiques parasitaires régulent l'expression des gènes et la différenciation de *T. annulata*.

I- 3) a. *La méthylation de H3K18me régule la différenciation parasitaire*

La marque H3K18me1 empêche la différenciation en mérozoïtes et l'avancement du cycle de vie du parasite. C'est l'utilisation de la chimie génétique qui nous a permis de lier H3K18me à son rôle majeur dans la différenciation parasitaire. Nous avons utilisé des « inhibiteurs d'enzymes épigénétiques » pour moduler les niveaux de H3K18me au sein des cellules infectées.

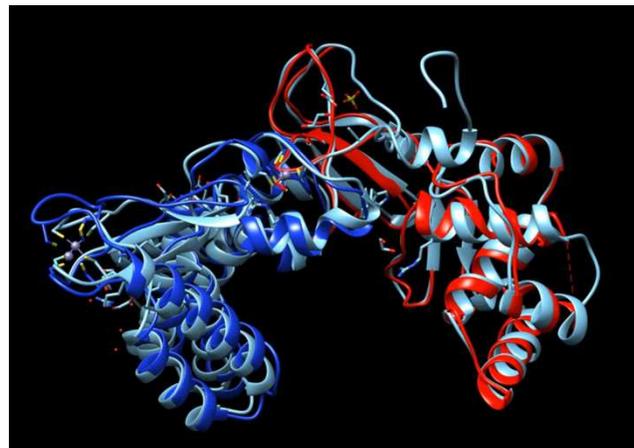
Il serait très intéressant d'étudier l'enrichissement de H3K18me1 à chaque étape du cycle de vie parasitaire pour déterminer le stade de son apparition et son importance pour les transitions d'un état à un autre. Pour cela, il serait judicieux de pouvoir récupérer, auprès des vétérinaires, des leucocytes bovins fraîchement infectés par *T. annulata*, mais aussi de maintenir en culture des érythrocytes bovins pour l'étape suivant la mérogonie. Nous avons montré que H3K18me1 a une fonction répressive sur certains gènes, notamment ceux associés à la mérogonie et que la diminution de cette marque, à cette étape du cycle de vie, rendrait possible l'expression de ces derniers (cf article Fig.4-5). Ce groupe de gènes enrichis en H3K18me1 comprend plusieurs protéines sécrétées : notamment les protéines « rhoptry », caractérisées comme étant de bonnes candidates dans l'invasion.^{17,145} Nous avons d'ailleurs étudié l'un de ces gènes en modulant son expression grâce à des molécules inhibitrices de déméthylation ou de déacétylation. Ces nouvelles molécules pourraient donc être d'intéressants potentiels antiparasitaires qui mériteraient plus d'investigation. D'ailleurs, les enzymes responsables de la méthylation ou de l'acétylation des résidus de lysine dans les queues d'histone sont des cibles pour les thérapies médicamenteuses dans différentes pathologies humaines dont le cancer. Nous sommes aux prémices des études sur la régulation épigénétique chez *T. annulata* mais d'après nos résultats, nous pouvons d'ores et déjà affirmer que cibler la machinerie de méthylation pour bloquer le cycle de vie parasitaire pourrait être une stratégie thérapeutique prometteuse.

I- 3) b. *TaSETup1 est la première enzyme épigénétique décrite chez T. annulata*

Les méthyltransférases à domaine SET sont les enzymes responsables de la majorité de la méthylation des résidus de lysine. Nous avons étudié les 5 méthyltransférases caractérisées chez *T. annulata*, possédant toutes un domaine SET (cf Fig. S10). Cela nous a permis d'identifier le premier acteur épigénétique chez ce parasite : TaSETup1, une enzyme capable de monométyler H3K18. Les méthyltransférases parasitaires, dues à leur faible nombre, sont probablement multifonctionnelles, avec diverses spécificités de substrat histone ou non histone.

L'homologue de TaSETup1 chez *T. gondii*, TgAKMT, est une protéine cytoplasmique importante pour la motilité du parasite. L'une des pistes pour mieux caractériser l'enzyme TaSETup1 a été de purifier cette dernière et de la faire cristalliser dans des conditions de tampon bien spécifiques : grâce à cela, nous avons obtenu une carte de diffraction de TaSETup1 à 4 Angstrom. L'alignement entre TgAKMT et TaSETup1 montre une forte similitude entre les 2 protéines (RMSD à 1,1angstrom).

Fig. 19 : La structure cristallographique de TaSETUP1(68-490aa) à 4.0 angstrom chez *T. annulata*, comparée à TgAKMT. La structure de AKMT est en bleu clair et celle de TaSETup1 est en bleu foncé avec le domaine SET en rouge. Image faite avec l'application Chimera.



TgAKMT et TaSETup1 ressemblent également aux protéines SMYD ayant des cibles et des fonctions cytoplasmiques et nucléaires.⁸⁶ Il serait très intéressant de transférer TaSETup1 chez *T. gondii* pour nous permettre de déterminer si sa localisation et fonction sont similaires à celles de son homologue TgAKMT. L'homologue de TaSETup1 chez *P. falciparum* est PfSET7, il peut métyler H3K4 et H3K9 et pourrait également avoir des fonctions cytoplasmiques ou nucléaires selon le stade de vie du parasite.¹⁴⁶

Nous avons aussi pu tester de nombreux anticorps fabriqués spécifiquement pour cibler TaSETup1 mais aucun d'entre eux n'a pu fournir un signal spécifique que ce soit en Immunofluorescence ou en Western blot. Enfin, nous avons cherché une manière d'inhiber spécifiquement l'activité de TaSETup1 en utilisant des inhibiteurs des protéines SMYD. Ces derniers n'ont eu aucun impact sur l'activité enzymatique ou la survie parasitaire.

L'idéal serait de pouvoir synthétiser un inhibiteur d'enzyme épigénétique, spécifique pour cette lysine méthyltransférase. Ce dernier, altérant le cycle de vie parasitaire pourrait être utilisé en traitement contre *T. annulata*.

I- 3) c. *Régulation chromatinienne chez les Apicomplexes*

L'enrichissement des marques histones à des locus précis est de mieux en mieux caractérisé. Dans cette étude, nous avons trouvé, par Chip-séquençage, la marque H3K4me3 enrichie au niveau des promoteurs des gènes actifs et souvent corrélée à d'autres marques activatrices principalement d'acétylation comme H3K18ac. Nous avons également remarqué une faible corrélation entre la marque H3K36me3 et H3K18me1 sur le génome parasitaire (cf article Fig S5). H3K36me3 est systématiquement retrouvée au niveau du corps des gènes pouvant être réprimés ou activement transcrits.¹⁴⁷ Chez le parasite *P. falciparum*, H3K36me3 joue un rôle central pour réprimer l'expression des gènes *var*, cette marque est d'ailleurs retrouvée recouvrant entièrement le corps des gènes, incluant le TSS. La délétion de l'enzyme SET responsable de cette marque, PfSETvs, entraîne l'expression de tous les gènes *var* simultanément, retirant une importante protection au parasite contre la réponse immunitaire de l'hôte. Éliminer l'enzyme responsable de la marque H3K36me3 et donc de la répression des 60 gènes *var*, pourrait être une stratégie thérapeutique indéniable.⁸² Chez *T. annulata*, nous n'avons pas observé de régions avec un fort enrichissement en H3K36me ou d'équivalent des gènes *var*. Il serait également intéressant de comparer la marque H3K18me à H4K31me décrite chez *T. gondii* et *P. falciparum*. Cette dernière est également présente sur le corps des gènes, et anti-corrélée avec la transcription, ralentissant la progression de l'ARN polymérase II.

Nous pourrions étudier si H3K18me a un effet similaire sur l'ARN Pol II chez *T. annulata*, expliquant sa fonction répressive. Cette marque histone a un rôle central dans l'infection, elle est retrouvée au niveau du corps des gènes réprimés, régulant le passage d'une étape du cycle de vie à une autre. Cibler l'enzyme TaSETup1 pourrait donc être une piste d'élimination parasitaire non négligeable.

Aussi, il aurait été intéressant de caractériser l'enrichissement sur le génome parasitaire de marques répressives comme H3K9me3 ou H3K27me3.¹⁴⁸ Ces PTM corrént le plus souvent avec une méthylation de l'ADN, pour sceller un état hétérochromatinien. Une étude sur le génome entier de *P. falciparum* a d'ailleurs souligné un rôle primordial de la méthylation de l'ADN. Cette dernière, régulant l'expression des gènes de virulence, est une cible thérapeutique à explorer.¹⁴⁹ À ce jour, aucune ADN-méthyltransférase ou déméthylase n'ont été caractérisées chez *Theileria*.

I- 3) d. *Une approche de « génétique chimique » pour étudier Theileria*

Nous avons développé des approches génomiques et protéomiques pour étudier comment le parasite *Theileria* et son hôte influencent mutuellement leurs épigénomes. Nous cherchons à identifier les mécanismes épigénétiques pouvant être ciblés par des inhibiteurs de petites molécules. Il est pour l'instant impossible de faire des modifications génétiques chez le parasite ; dans notre situation, l'alternative appelée « chimie génétique » semble être la plus adaptée.¹⁵⁰ Le but étant que ces inhibiteurs moléculaires d'enzymes épigénétiques traitent l'infection parasitaire ainsi que la transformation de la cellule hôte (certains de ces composés sont déjà au stade d'essais cliniques contre le cancer).

Ces petites molécules inhibitrices peuvent cibler la machinerie épigénétique de l'hôte, du parasite ou des deux. Ces composés affecteraient la régulation de l'expression des gènes hôtes ou/et parasites ce qui perturberait les interactions hôte-parasite.

Nous avons créé un pipeline expérimental qui pourrait servir d'approche systématique pour identifier les marques de méthylation et rechercher de nouvelles molécules candidates.

Cette méthode, déjà prometteuse au vu des premiers résultats obtenus au laboratoire, pourrait être étendue à d'autres espèces d'Apicomplexes, en voici les étapes :

- 1- une identification génomique et bioinformatique des cibles potentielles de lysines méthyltransférase (KMT) et déméthylase (KDM) ;
- 2- une caractérisation biochimique de la spécificité et de l'activité de l'enzyme KMT ;
- 3- une collaboration avec des chimistes médicaux ayant l'expérience du développement épigénétique d'inhibiteurs du cancer et une bibliothèque validée de petites molécules ;
- 4- un criblage biochimique en caractérisant par HPLC si l'activité de l'enzyme étudiée est inhibée par le composé
- 5- une validation avec de multiples marqueurs et techniques, notamment microscopiques, pour sélectionner les composés ayant un effet antiparasitaire.

Ces criblages de méthyltransférases, bien qu'à débit moyen, fournissent une très grande quantité d'informations. Ils permettent à travers de solides expériences *in vitro*, d'étudier les enzymes hôtes ou parasites ayant un rôle majeur dans l'interaction hôte-parasite qu'il serait intéressant de cibler. Cela nous permet également grâce à de la chimie génétique, utilisant de petites molécules inhibitrices, de caractériser les composés ayant un effet spécifique sur ces enzymes.

Ces données sont combinées à un criblage de microscopie confocale automatisé à haut contenu avec les mêmes molécules : nous pouvons obtenir des données multiparamétriques importantes concernant le nombre de parasites, la survie cellulaire, les marqueurs épigénomiques (en marquant spécifiquement certaines marques histones hôtes ou parasites...), etc. Cibler la méthylation spécifique au parasite est donc une piste très prometteuse pour de nouvelles thérapies contre les interactions hôte-pathogène.

Criblage 1

II- Découverte d'un nouvel anti-theilerial grâce à un criblage microscopique de la « Medicines for Malaria Venture (MMV) Pathogen Box »

Dans l'étude H3K18me, nous avons découvert une nouvelle marque histone spécifique au parasite et nous cherchions à déterminer son rôle dans l'infection. Ce raisonnement est inversé dans les deux parties suivantes. Nous avons mis en place un criblage microscopique et testé deux types de bibliothèques pour lesquelles l'effet d'un composé sur l'infection a d'abord été déterminé, pour ensuite rechercher sa cible et son mode de fonctionnement.

II- 1) Introduction

II- 1) a. Développement d'un criblage cellulaire

Nous avons mis en place un criblage microscopique à haut-débit sur des macrophages infectés par *T. annulata*, les Tac12 (cf article Fig. 1a). Ces cellules adhérentes ont été traitées en triplicats dans des plaques de 96 puits. Grâce au microscope confocal OPERA de l'Institut Pasteur, nous avons réalisé un grand nombre d'images, environ 30 champs par puits. La qualité des images a permis d'exploiter ces données grâce au logiciel Acapella, ce qui a été complété par une analyse bioinformatique des résultats. Cette approche de criblage microscopique nous a fourni plusieurs paramètres sur l'état des cellules infectées suite aux différents traitements. La survie de la cellule hôte a été quantifiée grâce à un marquage des noyaux cellulaires par le DAPI. Le DAPI étant un intercalant d'ADN, les noyaux parasitaires ont également été marqués. Pour définir plus facilement la charge parasitaire par cellules hôtes, nous avons utilisé la marque histone spécifique au parasite : H3K18me1. Cette dernière nous indiquera la survie parasitaire et l'effet des composés sur les niveaux de méthylation. Dans le type cellulaire TaC12-GFP que nous utilisons au laboratoire, la structure du schizonte est visible, grâce à la protéine hôte CLASP1, séquestrée au parasite, couplée à la GFP. Cela permet d'étudier la conformation du syncitium parasitaire en réponse aux différents traitements.

II- 1) b. *Librairie de molécules connues dans d'autres infections*

La quête de nouvelles molécules efficaces contre les infections qu'elles soient parasitaires, bactériennes ou autres, devient primordiale notamment à cause des problèmes de résistance aux traitements existants. Ce phénomène se produit pour les maladies humaines mais également animales comme dans notre cas, avec une émergence de résistance à la Buparvaquone, seul traitement efficace contre la Theileriose.⁶⁴ Cela met donc en évidence le besoin d'options thérapeutiques alternatives et les banques de composés comme celle de la « Pathogen Box MMV » sont une ressource inestimable pour rechercher de nouveaux traitements. Cette étude repose sur un criblage microscopique suivi de nombreux tests pour déterminer précisément l'effet et le mode d'action du composé candidat le plus prometteur de la bibliothèque Pathogen Box MMV.

La « Pathogen Box » est une riche ressource de composés en libre accès. Elle contient 400 molécules diverses et actives contre un large éventail d'agents pathogènes. Plus particulièrement, contre des « maladies tropicales négligées » et qui affectent plus d'un milliard de personnes. (Fig.2) Ces maladies touchent principalement les populations pauvres, en contact étroit avec les vecteurs infectieux (moustiques), ou le bétail.

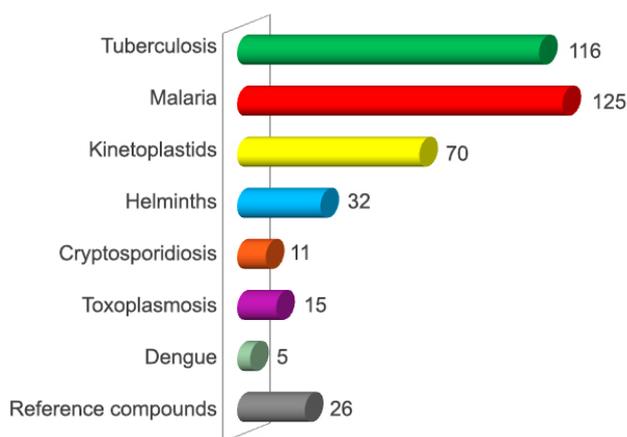


Fig. 20 : Panel de maladies ciblées par la Pathogen Box incluant d'autres parasites Apicomplexes comme *Plasmodium*, *Cryptosporidium* ou *Toxoplasma*. La Buparvaquone se trouve dans les composés de référence. Le hit découvert dans le criblage fait partie de la catégorie des Kinétoplastides.

<https://www.mmv.org/mmvmv-open/pathogen-box/about-pathogen-box>

Le composé prometteur découvert dans cette étude, la Trifloxystrobine, est classé dans le groupe de molécules ciblant les Kinétoplastides. Ce groupe de protistes inclut des parasites comme Trypanosome. Cependant, la Trifloxystrobine est un fongicide à large spectre utilisé pour traiter les agents pathogènes des plantes. Cette molécule a une cible et un mode d'action différents de la Buparvaquone, mais un impact similaire sur l'infection, ce qui fait d'elle un nouveau traitement potentiel contre *Theileria*.

II- 2) Publication

Novel drug against *Theileria* parasites

1

1 Target journal: *Communications Biology*

2

3

4 TITLE

5

6

7

8

9 Authors

10

11

12

13

14 Affiliations

15

16

17

18

19 Address correspondence to:

20 Professor Jonathan Weitzman

21 UMR 7216 Epigenetics and Cell Fate

22 Université de Paris, CNRS

23 Bâtiment Lamarck, Case 7042, 35 rue Hélène Brion

24 75205 PARIS cedex 13, France

25 email : jonathan.weitzman@u-paris.fr

26 ABSTRACT

27 *Theileria* parasites are responsible for devastating cattle diseases, causing major economic losses
28 across Africa and Asia. *Theileria* spp. stand apart from other apicomplexa parasites by their ability to
29 transform host leukocytes into immortalized, hyperproliferating, invasive cells that rapidly kill infected
30 animals. The emergence of resistance to the theilericidal drug Buparvaquone raises the need for new
31 anti-*Theileria* drugs. We developed a microscopy-based screen to reposition drugs from the open-
32 access Medicines for Malaria Venture (MMV) Pathogen Box. We show that Trifloxystrobin
33 (MMV688754) selectively kills lymphocytes or macrophages infected with *T. annulata* or *T. parva*
34 parasites. Trifloxystrobin treatment reduced parasite load *in vitro* as effectively as Buparvaquone, with
35 similar effects on host gene expression, cell proliferation and cell cycle. Trifloxystrobin also inhibited
36 parasite differentiation to merozoites (merogony). However, MMV688754/Trifloxystrobin inhibition
37 of parasite survival is independent of the parasite TaPin1 prolyl isomerase pathway and could provide
38 an effective alternative to Buparvaquone treatment to treat drug-resistant strains. Trifloxystrobin
39 represents a promising candidate for future drug development against *Theileria* spp.

40 Introduction

41 *Theileria* spp. belong to the phylum of Apicomplexa parasites that cause important zoonotic and
42 human diseases, including malaria (*Plasmodium* spp.) and toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*)¹⁻³. The
43 global burden of mortality from apicomplexa infections has driven international efforts to create
44 collaborative drug-discovery programs. The open-access Medicines for Malaria Venture (MMV)
45 Pathogen Box includes four hundred compounds that have been tested against a wide range of
46 parasites and pathogens⁴. Here, we describe the re-purposing of compounds from the anti-malarial
47 initiative to screen for drugs against *Theileria* spp.

48

49 The intracellular parasite *Theileria* spp. causes tick-borne diseases in sub-Saharan Africa, Asia and the
50 Middle East with significant socioeconomic impact on livestock; Tropical Theileriosis is caused by *T.*
51 *annulata* infections and East Coast Fever is caused by *T. parva*^{2,3}. Current treatment regimens include
52 the theilericidal drug Buparvaquone (also known as BW720C)⁵, but reports of the emergence of drug-
53 resistant strains in Tunisia, Iran, Turkey and Sudan raise new concerns for disease management⁶⁻⁸.
54 Point mutations in *Theileria* cytochrome b were described in some cases^{9,10}, while we recently
55 discovered mutations in the parasite gene encoding TaPin1 in Buparvaquone-resistant isolates from
56 Tunisia and Sudan^{6,7}. Thus, there is a need to identify drugs that are effective against both *T. parva* and
57 *T. annulata* species with a new mode of action that does not involve these targets prone to resistance
58 acquisition.

59

60 The two transforming *Theileria* species (*T. parva* and *T. annulata*) have the remarkable ability to induce
61 cancer phenotypes in infected macrophages and lymphocytes and several studies have described
62 mechanisms by which the parasites manipulate their host cells^{1,11,12}. These include the induction of
63 signaling pathways (such as JNK/AP-1 or Myc), the sequestration of host proteins (such as IKK or EB1)
64 and the secretion of effectors^{11,13-19}. The TaPin1 prolyl isomerase is secreted by intracellular *Theileria*
65 parasites and contributes to their transforming ability by activating key signaling pathways²⁰: the
66 TaPin1-Fbw7 pathway leads to oncogenic proliferation and the TaPin1-PKM2 pathway activates
67 glycolytic enzymes important for metabolic reprogramming^{6,21}. There are likely other mechanisms that
68 contribute to the hijacking of host cell functions¹². Identifying new anti-*Theileria* compounds will offer
69 new therapeutic options and will provide molecular tools for a chemical genetics approach to
70 investigate host-parasite interactions.

71

72 Here, we describe the development of a microscopy-based screening strategy to identify compounds
73 that could be effective drugs against *Theileria*. We screened compounds from the MMV Pathogen Box
74 library and found several that killed B cells infected with *T. annulata* parasites. Subsequent

75 characterisation, including parasite lethality, host cell proliferation and gene expression, narrowed
76 down the most promising compounds to Trifloxystrobin (MMV688754), a broad-spectrum fungicide
77 widely used to treat plant pathogens. Importantly, we also demonstrate that MMV688754 blocks
78 parasite differentiation to merozoites and acts independently of the TaPin1 mechanism opening new
79 possibilities for the treatment of resistant strains.

80

81

82 RESULTS

83 A microscopy-based screen for MMV Pathogen Box compounds against *Theileria*-infected 84 macrophages

85 We developed a microscopy-based strategy for screening the MMV Pathogen Box library of
86 compounds that allowed for high-content assessment of the drug impact. We chose to use the *T.*
87 *annulata*-infected bovine macrophage cell line Tac12, because of ease of imaging and parasite
88 monitoring. We used a derived cell line expressing a GFP-CLASP1 fusion protein, a host microtubule-
89 stabilizing protein that is recruited to the schizont surface and allows visualization of intracellular
90 parasites²². Finally, we also included staining with an antibody against histone H3K18 methylation
91 (H3K18me1), an epigenetic mark that is exclusive to parasite nuclei²³. In this way we could automate
92 the screening for MMV Pathogen Box compounds (as previously developed for anti-*Leishmania*
93 drugs²⁴) and generate screening information for host cell numbers (DAPI imaging of host nuclei),
94 schizont shape and distribution (Green, GFP imaging) and parasite numbers per host cell (Red, anti-
95 H3K18me1 imaging) [Figure 1a]. We expect compounds that kill the parasite will also result in host cell
96 apoptosis and reduced host cell survival²⁵. We conducted an initial screen at 10 μ M concentration,
97 incubated for 48 hours, and assessed host cell survival by comparing host cell nuclei numbers with
98 DMSO-treated control samples [Figure 1b]. This experiment identified 44 compounds that gave
99 survival rates for host cells of less than 25%. We then repeated the screen at 2 μ M concentrations
100 [Figure 1b] and identified 9 compounds that killed host cells even at the lower concentration,
101 highlighting the sensitivity and specificity of the screen. We compared these hit compounds with those
102 from previously reported screens of the MMV library against *T. annulata*, *T. parva* or *T. equi* parasites
103 [Figure 1c]^{4,26–28}. Interestingly, these previous screens exhibited very little overlap in the hit compounds
104 identified, but at least four of the compounds we identified were also found in previous studies
105 (MMV003152, MMV675968, MMV676600 and MMV688372). Buparvaquone (MMV680480) was not
106 picked up in our initial screen as it did not kill host cells to less than 25% survival; neither was it
107 identified in the majority of the other MMV screening studies. Thus, our microscopy-based screen
108 identified 9 promising compounds that kill infected host cells at 2 μ M, some of which are consistent
109 with previous screening results using alternative methodologies.

110

**111 MMV668754/Trifloxystrobin effectively reduced parasite and host cell survival of *Theileria*-infected
112 lymphocytes**

113 One advantage of our screening strategy is the additional information gleaned from the microscopic
114 data. We assessed the impact of the 9 primary hit compounds (identified at 2 μ M) on parasite load per
115 infected macrophage. Although all 9 compounds resulted in less than 25% host cell survival, only two
116 compounds significantly reduced the number of parasites per host cell, as assessed by the number of
117 H3K18me1-positive nuclei [Figure 2a]. The most effective of these, by far, was the MMV668754
118 compound which corresponds to the drug Trifloxystrobin. This compound was more effective at
119 reducing host cell survival and parasite cell number than Buparvaquone, the standard-of-care drug to
120 treat *Theileria*-infected cows [Figure 2b]. Some of the other 7 compounds caused a slight increase in
121 the number of parasites per cell (which may be part of a general stress response). We chose to study
122 the MMV668754/Trifloxystrobin compound in further detail.

123

124 To explore drug action further, we switched to additional *Theileria*-infected cell models. We tested the
125 TBL3 vs BL3 paired bovine B sarcoma cell lines, that offers the advantage of comparing drug activity on
126 infected vs uninfected cells. We treated *T. annulata*-infected TBL3 cells with MMV compounds from
127 our primary screen and compared with uninfected BL3 controls. Testing the 9 MMV compounds from
128 the initial macrophage TaC12 screen at 2 μ M, we observed that 4 of the compounds reduced cell
129 survival of infected TBL3 by more than 50% [Figure 3a], but only two compounds (MMV688372 and
130 MMV668754) demonstrated selective killing of infected TBL3 cells compared to uninfected cells (more
131 than 80% survival) [Figure 3a], with EC₅₀ values of 2.5 μ M and 1.5 μ M, respectively [Figure 3b]. We
132 examined the effects of these two compounds on the cell cycle of TBL3 and BL3 cells and compared
133 with Buparvaquone treatment. Buparvaquone was previously shown to induce a G1 growth-arrest in
134 TBL3 lymphocytes, reduced S1 phase and increased apoptosis (assessed by sub-G1 population), with
135 relatively little effect on uninfected BL3 cells^{25,29} [Figure 3c]. We observed similar effects for the
136 MMV668754 compound (significant increases in G1 and sub-G1 populations) for TBL3 cells, but not
137 BL3 cells [Figure 3c]. This was not the case for the MMV688372 compound. Thus, the
138 MMV668754/Trifloxystrobin drug appears to be as effective as Buparvaquone in its specific effects on
139 parasite-infected lymphocytes.

140

141 We conducted further experiments comparing the effects of the MMV688372 and MMV668754
142 compounds with Buparvaquone treatment on *T. annulata*-infected macrophages (TaC12) and B
143 lymphocytes (TBL3) and *T. parva*-infected lymphocytes (TpM) [Figure 4]. We measured the average
144 number of parasites per host cell in these three cellular scenarios and obtained similar results despite

145 the different parasite species and different host cell types. MMV668754/Trifloxystrobin was as
146 effective as Buparvaquone in significantly reducing parasite load in macrophages and lymphocytes
147 infected with *T. annulata* or *T. parva* parasites [Figure 4a]. In contrast, the MMV688372 compound
148 was similar to controls and did not affect parasite survival. Hemphill and colleagues recently proposed
149 an elegant quantitative RT-PCR assay for assessing drug activities against intracellular *Theileria*
150 schizonts³⁰. We applied this TaSP assay to test drug impact on parasite viability and observed effective
151 reduction in the *TaSP/bACTIN* mRNA ratios by treatment with MMV668754/Trifloxystrobin or
152 Buparvaquone, but not MMV688372 or DMSO controls [Figure 4b].

153

154 These combined results show that MMV668754/Trifloxystrobin is effective in killing infected bovine
155 leukocytes and is comparable with Buparvaquone treatment in targeting *T. annulata* and *T. parva*
156 schizonts in bovine lymphocytes and macrophages.

157

158 **MMV668754/Trifloxystrobin does not inhibit TaPin1 prolyl isomerase activity**

159 All the experiments described above showed that MMV668754/Trifloxystrobin was equivalent to
160 Buparvaquone in its ability to reduce parasite number and kill infected cells. Buparvaquone was shown
161 to target host TaPin1 prolyl isomerase and/or cytochrome B^{6,10,31}. The worrying emergence of
162 Buparvaquone resistance was associated with mutations in the TaPin1 parasite gene that affected
163 Buparvaquone inhibition of TaPIN1 catalytic activity^{6,7}. Therefore, we tested whether MMV668754
164 also inhibited TaPin1 activity using a previously described *in vitro* assay⁶. We chose to compare
165 MMV668754 with the DTM (dipentamethylene thiuram monosulfide) Pin1 inhibitor⁶ as the latter is
166 chemically distinct from Buparvaquone and MMV668754 [Figure 5a]. We produced recombinant His-
167 tagged TaPin1 protein and investigated drug specificity and isomerase activity [Figure 5b]. DTM
168 treatment effectively blocked TaPin1 activity in the *in vitro* assay, but MMV668754 had no effect
169 [Figure 5c]. We previously showed that the DTM inhibition of TaPin1 was unaffected by mutations that
170 block Buparvaquone inhibition⁶; it seemed unnecessary to test these TaPin1 variants, as MMV668754
171 did not block wild-type activity. These results suggest that MMV668754/Trifloxystrobin inhibition of
172 parasite survival is independent of the TaPin1 pathway and could provide an effective alternative to
173 Buparvaquone treatment and be applied to treat Buparvaquone-resistant strains.

174

175 **MMV668754/Trifloxystrobin inhibits parasite-induced transformed phenotypes and parasite 176 differentiation**

177 A remarkable feature of *Theileria* spp is the ability to induce transformation of host leukocytes^{11,13}.
178 Many studies have shown that Buparvaquone is an effective inhibitor of many of these transformed
179 phenotypes, including proliferation and invasion^{25,32-34}. In addition, several genes have been identified

180 as key biomarkers of host cell transformation. We tested the effects of MMV668754 treatment on the
181 expression of host genes in *T. annulata*-infected macrophages (TaC12) and B lymphocytes (TBL3). We
182 found that MMV668754/Trifloxystrobin treatment was similar to Buparvaquone in its inhibition of host
183 gene expression for the proliferative *oncomiR-155*, the invasive *MMP-9* gene and genes encoding
184 metabolic enzymes Hexokinase 2 and PDK1 [Figure 6a]. These genes are downstream of activated host
185 transcriptional networks including c-Jun/AP-1 and HIF1 α ^{25,32,33,35}. We also tested the ability of
186 MMV668754/Trifloxystrobin to block host cell proliferation using a classic soft-agar colony growth
187 assay. The colony growth of infected TBL3 cells was completely blocked by Buparvaquone and
188 significantly reduced by adding MMV668754 [Figure 6b]. In contrast, treatment with the MMV688372
189 drug had no effect on the expression of host genes induced by *Theileria*, or on colony growth of TBL3
190 cells [Figure 6a-b]. Thus, MMV668754/Trifloxystrobin selectively reduced the gene expression and
191 proliferation associated with parasite-induced transformation.

192

193 Finally, we tested the effect of MMV668754/Trifloxystrobin treatment on the ability of *Theileria*
194 parasites to differentiate from schizonts to merozoites. The merogony differentiation process can be
195 induced by incubating infected macrophages at 41°C for 8 days. Merogony was accompanied by a
196 characteristic change in the size and number of parasite nuclei and induction of the merogony marker
197 gene *TamR1*³⁶. TaC12 cells were induced to merogony in the presence of different drugs. We observed
198 a three-fold reduction in the number of macrophages containing expanded parasite numbers and we
199 saw a significant reduction in *TamR1* expression in cells incubated with MMV668754/Trifloxystrobin,
200 whereas the MMV688372 drug had no impact on parasite differentiation.

201

202

203 DISCUSSION

204 Anti-microbial drug resistance is emerging as a significant global problem in the treatment of disease.
205 This is not restricted to human diseases, but extends to the large number of animal diseases that can
206 wreak havoc on farms and livestock with considerable socio-economic impact. *Theileria* spp parasites
207 cause major diseases in cattle and the emergence of parasite strains resistant to the widespread drug
208 Buparvaquone highlights the need for alternative therapeutic options^{9,37}. The compound libraries of
209 the MMV initiative offer a trove to search for new anti-*Theileria* drugs with modes of action that are
210 independent of Buparvaquone⁴. Here we describe a screen of the four hundred compounds of the
211 MMV Pathogen Box and subsequent tests that led to the identification of MMV668754/Trifloxystrobin
212 as a novel anti-*Theileria* drug candidate.

213

214 Our study involved a series of increasingly stringent assays to select the more promising drug
215 compound from the MMV Pathogen Box library⁴. We previously demonstrated that microscopy-based
216 screens followed by careful phenotypic characterization present a powerful drug-discovery strategy²⁴.
217 Our microscopy screening approach recorded a number of parameters including host nuclei number,
218 parasite schizont structure and the parasite load per host cell. By screening the Pathogen Box at 10
219 μM and 2 μM we initially focused on the more effective compounds (9 initially) with cytotoxicity
220 against infected bovine macrophages. The subsequent criteria focused on parasite impact (decreased
221 parasite survival per host cell) and infected vs uninfected selectivity (TBL3 vs BL3 cytotoxicity) led us
222 to MMV668754 as the most promising candidate. The MMV668754 compound was as effective as the
223 care-standard Buparvaquone drug in nearly all the assays we tested. Both compounds are effective
224 against both *T. annulata* and *T. parva* species, as well as different host cell types (macrophages or
225 lymphocytes). We also showed that MMV668754 treatment caused growth arrest and apoptosis and
226 blocked colony growth in soft-agar assays. These effects were associated with reduced expression of
227 a number of bovine genes linked to transformation, including *MMP9*, *miR-155* and *HK2*. Despite the
228 similarity in the effects of MMV668754 and Buparvaquone in all the functional assays, we show that
229 their modes of action are likely to be distinct, as MMV668754 did not inhibit the catalytic activity of
230 the TaPin1 prolyl isomerase which was reported to be mutated in Buparvaquone-resistant parasites^{6,7}.
231 We predict that MMV668754 inhibits an alternative mechanism and combined MMV668754 and
232 Buparvaquone drug protocols might offer reduced chances of double drug-resistance. The molecular
233 targets of MMV668754 will be of interest for further studies and could shed light on how *Theileria* spp.
234 hijack host cell pathways. MMV668754 is the drug Trifloxystrobin which is a broad-spectrum fungicide
235 used against many fungal pathogens in pest control for grapes, apples and peanuts. Trifloxystrobin is
236 thought to work by interfering with the mitochondrial respiration pathway.

237

238 The MMV Pathogen Box is a rich resource of compounds tested against a wide range of pathogens⁴.
239 Several screens of this library for anti-*Theileria* compounds have reported different sets of potential
240 hit compounds with relatively little overlap^{4,26,28,38}. This may result from the different screening
241 strategies, focusing mostly on host cell cytotoxicity. As shown in Figure 1c, our experimental strategy
242 identified several compounds that overlap with those identified in other screens. Our series of
243 subsequent assays, including quantification of the parasite load per host cell, comparing matched
244 infect vs uninfected cells lines and testing against different *Theileria* species in both macrophages and
245 lymphocytes, allowed us to focus on a single compound that is a promising new potential drug. Future
246 studies will be required to identify the drug target (such as our example with TaPin1 and
247 Buparvaquone) and generate chemical derivatives for drug optimization before *in vivo* validation.

248

249

250 **METHODS**251 **Cell culture and drug screening**

252 All bovine cell lines were previously documented: TBL3 cells were derived from *in vitro* infection of the
253 spontaneous bovine B lymphosarcoma cell line, BL3, with Hissar stock of *T. annulata*. TaC12 is a line of
254 *T. annulata*-infected bovine macrophages. The TpMD409 lymphocyte cell line is infected with *T. parva*.
255 Cells were cultured in RPMI 1640 (Gibco-BRL), supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine
256 serum (FBS), 4 mM L-glutamine, 25 mM HEPES, 10 mM β -mercaptoethanol and 100 mg/ml of
257 penicillin/streptomycin in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. For screening, TaC12 infected
258 macrophages expressing a GFP-CLASP fusion protein were plated in 96-well plates and treated with
259 the MMV compounds (at 10 μ M, 2 μ M or 0.4 μ M concentrations) for 48 hours. Immunofluorescence
260 was performed on fixed cells using a specific anti-H3K18me1 antibody to label the parasite nuclei. Cells
261 were incubated with DAPI to detect host and parasite nuclear DNA. The parasite surface membrane
262 was detected using GFP-CLASP fluorescence. Image capture (30 fields per condition) and analysis was
263 performed with the Opera Phenix microscope (Perkin Elmer, Photonic BioImaging platform, Pasteur
264 Institute) and the associated Acapella Software to monitor host and parasite survival [See Figure 1a].

265

266 **Assays for cell viability, proliferation and cell cycle analysis**

267 To measure cell viability, 1×10^4 cells were plated in 96-well plates in triplicate before MMV drug
268 treatments for 48 hours. Cell viability was measured using the Cell Proliferation Kit II-XTT (Roche) and
269 the GloMax-Multi Detection System (Promega) following manufacturers' instructions.

270 We used a two-layer soft-agar culture system to assay for colony formation and proliferation. 2×10^4
271 bovine cells were plated in 1.5 ml agarose (0.7% SeaKem ME Agarose; Lonza, ref: 50011, plus 2x DMEM
272 20% fetal calf Serum) over a 1.5-ml base layer (1% SeaKem ME Agarose plus 2X DMEM 20% fetal calf
273 Serum) in 6-well plates. Cultures were incubated in humidified 37°C incubators with 5% CO₂ in air and
274 monitored for growth using a microscope. At the time of maximum colony formation (10–15 days in
275 culture), final colony numbers were counted manually after fixation a staining with 0.005% Crystal
276 Violet (Sigma, ref: C3886).

277 For cell cycle analysis, cells at 1×10^4 /ml were stained with propidium iodide (PI) after different drug
278 treatments. Cells are washed in PBS, fixed in ice-cold ethanol (70% v/v) and stored at 4°C. For analysis,
279 cells were washed in PBS and suspended in PI (25 μ g/ml) in PBS with RNase A (200 mg/ml). Around,
280 10^5 events for each sample were analyzed. Flow cytometry analyses were carried out on a FACScalibur
281 system (BD Biosciences).

282

283

284 Schizont differentiation (merogony)

285 Macroschizont infected TaC12 cells were induced to differentiate to merogony by increasing the
286 incubation temperature to 41°C. Cells were passaged each time they reached confluence and 2×10^6
287 cells collected at day 0 (macroschizont stage) and day 8 (merogony stage) for RNA extraction and 4×10^3
288 cells per immunofluorescence at the same time-points.

289

290 Immunofluorescence analysis

291 Cultured *T. annulata*-infected macrophages (TaC12) were washed with PBS containing 1 mM EDTA and
292 3×10^4 cells per slide were centrifuged with Cytospin (10 min at $277 \times g$) to adhere to the slide. Cells were
293 fixed in 3.7% paraformaldehyde for 15 min and subsequently permeabilized in 0.2% Triton X-100
294 (prepared in PBS) for 10 min. Fixation, permeabilization and all the following steps were carried out at
295 room-temperature. Slides were blocked with PBS 0.2% Tween (PBST)–1% BSA for 30 min. Primary
296 antibodies were diluted in PBST and incubated for 1 hour with rabbit anti-H3K18me1 (ab177253,
297 Abcam, 1:5000 dilution). Cells were subsequently washed three times with PBST and incubated with
298 secondary antibody for 30 min with Alexa594-conjugated donkey anti-rabbit antibody (1:500 dilution).
299 Cells were washed three times with PBST and finally, mounted on coverslips adding ProLong Diamond
300 Antifade Mountant implemented with DAPI counterstain (Thermo Fischer Scientific). Samples were
301 analysed using a Leica DMI6000 epifluorescence microscope. Images were generated and processed
302 using Metamorph and ImageJ software. Parasite survival was quantified by counting parasite nuclei in
303 the host cytoplasm by DAPI. The macroschizont or merogony stages were quantified using ImageJ. We
304 defined a threshold for the Schizont/Merogony cycle stage of 50 parasites per host cell.

305

306 RNA extraction and RT-qPCR:

307 Total RNA was extracted using a Nucleospin RNA extraction kit (MachereyNagel) following the manu-
308 facture's protocol. 1 µg of total RNA was reverse transcribed with Superscript III Reverse transcriptase
309 Kit (Invitrogen). Real-time quantitative PCR was performed to analyze relative gene expression levels
310 using SyberGreen Master Mix (Applied Biosystem) following the manufacturer's protocol. Relative
311 expression values were normalized with housekeeping gene mRNA *HSP70* or bovine *Actin*. The primer
312 sequences used are listed in Supplementary Table 2.

313

314 Analysis of TaPin1 Prolyl isomerase activity:

315 Complementary DNA (cDNA) coding for the short form (amino acids 19-145) of *T. annulata* TaPin1
316 protein was amplified from TBL3 cells global cDNA and subcloned into pET28a plasmid using NdeI/XhoI
317 restriction enzymes. BL21 HI-Control™ (DE3) *E. coli* were transformed with pET28a TaPin1 plasmid in
318 order to express and purify 6xHis-tagged recombinant proteins. To produce recombinant TaPin1

319 protein, *E. coli* bacteria were cultured at 37°C to an OD of 0.6. Protein expression was then induced by
320 adding 500 µM isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid (IPTG) and lowering the temperature to 16°C
321 overnight. The bacteria were pelleted by centrifugation (4400 rpm, 20 min), washed with cold PBS, and
322 harvested by centrifugation (4400 rpm, 15 min). Pellets were then stored at 80°C or used directly.
323 Bacteria were resuspended in lysis buffer (PBS 1X, 300 mM NaCl, pH 8, 1 % Triton X-100, 1 mg/ml
324 lysozyme and protease inhibitor cocktail) and incubated for 30 min at 4°C under agitation. Lysates were
325 sonicated on ice (10 sec ON, 20 sec OFF, 10 min run and 20% power) and centrifuged (15,000 g, 30
326 min, 4°C). The supernatant was incubated 2 h on ice in the presence of 10 mM imidazole and His-select
327 nickel beads (Sigma). Beads were then poured into a column and washed successively with washing
328 buffer (PBS 1X, 300 mM NaCl, pH 8) containing 0.1% Triton X-100 and washing buffer alone. Proteins
329 were eluted in elution Buffer (PBS 1X, 300 mM NaCl, pH 8- and 300-mM imidazole) and reduced with
330 10 mM DTT for 20 min on ice. The purified protein was then buffer exchanged into TaPin1 buffer (35
331 mM HEPES, pH 8) using a PD 10 desalting column (GE Healthcare). Protein concentration was measured
332 using the Bradford assay with BSA as standard and protein purity was assessed by SDS-PAGE analysis.
333 Proteins were stored at -80°C until used. To measure catalytic activity TaPin1 (10 µM) was incubated
334 overnight at 4°C with 500 µM DTM, MMV688754 or vehicule (DMSO). Mixtures were diluted 1000-fold
335 (10 nM final Tapin1, 500 nM final inhibitors) and incubated with 0.2 mg/ml chymotrypsin
336 (Sigma, C4129) and 60 µM generic TaPin1 substrate peptide Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-pNA (Bachem, L-
337 1635) in cold TaPin1 buffer. Isomerization was followed by reading the absorbance of the solution at
338 380 nm for 1 min using a spectrophotometer (UV-1650PC, Shimadzu, France). Absorbances were then
339 plotted against times and curves were non-linearly fitted using equation (OriginPro 8.0). k_{obs} (apparent
340 velocity constant) values were extrapolated from these fits.

341

342 References

- 343 1. Spooner, R. L., Innes, E. A., Glass, E. J. & Brown, C. G. D. *Theileria annulata* and *T. parva* infect
344 and transform different bovine mononuclear cells. *Immunol.* **66**, 284–288 (1989).
- 345 2. Morrison, W. I. Progress towards understanding the immunobiology of *Theileria* parasites.
346 *Parasitology* vol. 136 1415–1426 (2009).
- 347 3. Irvin, A. D. Immunity in theileriosis. *Parasitology Today* vol. 1 124–128 (1985).
- 348 4. Van Voorhis, W. C. *et al.* Open Source Drug Discovery with the Malaria Box Compound
349 Collection for Neglected Diseases and Beyond. *PLoS Pathog.* **12**, e1005763 (2016).
- 350 5. McHardy, N., Wekesa, L. S., Hudson, A. T. & Randall, A. W. Anti*Theileria* activity of BW720C
351 (buparvaquone): A comparison with parvaquone. *Res. Vet. Sci.* **39**, 29–33 (1985).
- 352 6. Marsolier, J. *et al.* *Theileria* parasites secrete a prolyl isomerase to maintain host leukocyte
353 transformation. *Nature* **520**, 378–382 (2015).

- 354 7. Salim, B. *et al.* Mutations in the TaPIN1 peptidyl prolyl isomerase gene in *Theileria annulata*
355 parasites isolated in Sudan. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **11**, 101–105 (2019).
- 356 8. Mhadhbi, M. *et al.* In vivo evidence for the resistance of *Theileria annulata* to buparvaquone.
357 *Vet. Parasitol.* **169**, 241–247 (2010).
- 358 9. Chatanga, E. *et al.* Evidence of multiple point mutations in *Theileria annulata* cytochrome b
359 gene incriminated in buparvaquone treatment failure. *Acta Trop.* **191**, 128–132 (2019).
- 360 10. Mhadhbi, M., Chaouch, M., Ajroud, K., Darghouth, M. A. & BenAbderrazak, S. Sequence
361 Polymorphism of Cytochrome b Gene in *Theileria annulata* Tunisian Isolates and Its
362 Association with Buparvaquone Treatment Failure. *PLoS One* **10**, e0129678 (2015).
- 363 11. Tretina, K., Gotia, H. T., Mann, D. J. & Silva, J. C. *Theileria*-transformed bovine leukocytes have
364 cancer hallmarks. *Trends in Parasitology* vol. 31 306–314 (2015).
- 365 12. Villares, M., Berthelet, J. & Weitzman, J. B. The clever strategies used by intracellular parasites
366 to hijack host gene expression. *Semin. Immunopathol.* **42**, 215–226 (2020).
- 367 13. Cheeseman, K. & Weitzman, J. B. Host-parasite interactions: an intimate epigenetic
368 relationship. *Cell. Microbiol.* **17**, 1121–32 (2015).
- 369 14. Latré De Laté, P. *et al.* *Theileria* highjacks JNK2 into a complex with the macroschizont GPI
370 (GlycosylPhosphatidylinositol)-anchored surface protein p104. *Cell. Microbiol.* **21**, e12973
371 (2019).
- 372 15. Dessauge, F. *et al.* c-Myc activation by *Theileria* parasites promotes survival of infected B-
373 lymphocytes. *Oncogene* **24**, 1075–83 (2005).
- 374 16. Woods, K. L. *et al.* Recruitment of EB1, a Master Regulator of Microtubule Dynamics, to the
375 Surface of the *Theileria annulata* Schizont. *PLoS Pathog.* **9**, e1003346 (2013).
- 376 17. Heussler, V. T. *et al.* Hijacking of host cell IKK signalosomes by the transforming parasite
377 *Theileria*. *Science* **298**, 1033–6 (2002).
- 378 18. Tajeri, S. & Langsley, G. *Theileria* secretes proteins to subvert its host leukocyte. *Biology of the*
379 *Cell* vol. 113 220–233 (2021).
- 380 19. Woods, K., Perry, C., Brühlmann, F. & Olias, P. *Theileria's* Strategies and Effector Mechanisms
381 for Host Cell Transformation: From Invasion to Immortalization. *Frontiers in Cell and*
382 *Developmental Biology* vol. 9 662805 (2021).
- 383 20. Medjkane, S. & Weitzman, J. B. Intracellular *Theileria* Parasites PIN Down Host Metabolism.
384 *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 134 (2020).
- 385 21. Marsolier, J., Perichon, M., Weitzman, J. B. & Medjkane, S. Secreted parasite Pin1 isomerase
386 stabilizes host PKM2 to reprogram host cell metabolism. *Commun. Biol.* **2**, 152 (2019).
- 387 22. Huber, S. *et al.* The Microtubule-Stabilizing Protein CLASP1 Associates with the *Theileria*
388 *annulata* Schizont Surface via Its Kinetochore-Binding Domain. *mSphere* **2**, e00215-17 (2017).

- 389 23. Cheeseman, K. *et al.* Dynamic methylation of histone H3K18 in differentiating *Theileria*
390 parasites. *Nat. Commun.* **12**, 3221 (2021).
- 391 24. Lamotte, S., Aulner, N., Späth, G. F. & Prina, E. Discovery of novel hit compounds with broad
392 activity against visceral and cutaneous Leishmania species by comparative phenotypic
393 screening. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
- 394 25. Marsolier, J. *et al.* OncomiR Addiction Is Generated by a miR-155 Feedback Loop in *Theileria*-
395 Transformed Leukocytes. *PLoS Pathog.* **9**, e1003222 (2013).
- 396 26. Nyagwange, J. *et al.* Leveraging the medicines for Malaria Venture malaria and pathogen
397 boxes to discover chemical inhibitors of East Coast fever. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **9**,
398 80–86 (2019).
- 399 27. Hostettler, I., Müller, J. & Hemphill, A. In vitro screening of the open-source medicines for
400 malaria venture malaria box reveals novel compounds with profound activities against
401 *Theileria annulata* schizonts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 3301–3308 (2016).
- 402 28. Nugraha, A. B. *et al.* Screening the Medicines for Malaria Venture Pathogen Box against
403 piroplasm parasites. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **10**, 84–90 (2019).
- 404 29. Cock-Rada, A. M. *et al.* SMYD3 promotes cancer invasion by epigenetic upregulation of the
405 metalloproteinase MMP-9. *Cancer Res.* **72**, 810–20 (2012).
- 406 30. Hostettler, I., Müller, J., Stephens, C. E., Haynes, R. & Hemphill, A. A quantitative reverse-
407 transcriptase PCR assay for the assessment of drug activities against intracellular *Theileria*
408 *annulata* schizonts. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **4**, 201–209 (2014).
- 409 31. Sharifiyazdi, H., Namazi, F., Oryan, A., Shahriari, R. & Razavi, M. Point mutations in the
410 *Theileria annulata* cytochrome b gene is associated with buparvaquone treatment failure. *Vet.*
411 *Parasitol.* (2012) doi:10.1016/j.vetpar.2012.01.016.
- 412 32. Cock-Rada, A. M. *et al.* SMYD3 promotes cancer invasion by epigenetic upregulation of the
413 metalloproteinase MMP-9. *Cancer Res.* **72**, 810–20 (2012).
- 414 33. Medjkane, S., Perichon, M., Marsolier, J., Dairou, J. & Weitzman, J. B. *Theileria* induces
415 oxidative stress and HIF1 α activation that are essential for host leukocyte transformation.
416 *Oncogene* **33**, 1809–1817 (2014).
- 417 34. Chaussepied, M. *et al.* TGF- β 2 induction regulates invasiveness of *Theileria*-transformed
418 leukocytes and disease susceptibility. *PLoS Pathog.* **6**, (2010).
- 419 35. Metheni, M., Lombès, A., Bouillaud, F., Batteux, F. & Langsley, G. HIF-1 α induction,
420 proliferation and glycolysis of *Theileria*-infected leukocytes. *Cell. Microbiol.* **17**, 467–72 (2015).
- 421 36. Schmuckli-Maurer, J., Shiels, B. & Dobbelaere, D. A. Stochastic induction of *Theileria annulata*
422 merogony in vitro by chloramphenicol. *Int. J. Parasitol.* **38**, 1705–1715 (2008).
- 423 37. Salim, B. *et al.* Mutations in the TaPIN1 peptidyl prolyl isomerase gene in *Theileria annulata*

- 424 parasites isolated in Sudan. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **11**, 101–105 (2019).
425 38. Hostettler, I., Müller, J. & Hemphill, A. In Vitro Screening of the Open-Source Medicines for
426 Malaria Venture Malaria Box Reveals Novel Compounds with Profound Activities against
427 *Theileria annulata* Schizonts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 3301–8 (2016).

428

429

430 Data availability

431 All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its
432 supplementary information files).

433

434 Author contributions

435 JBW developed the concept and provided overall supervision

436 JBW and GFS sought funding and supervised experiments

437 JBW, MV, NL, and JB designed the study, analysed the results and wrote the manuscript

438 NL, SL and GFS developed the microscopy-based screening approach

439 MV, NL, JB and SL performed the experiments

440

441 Acknowledgements

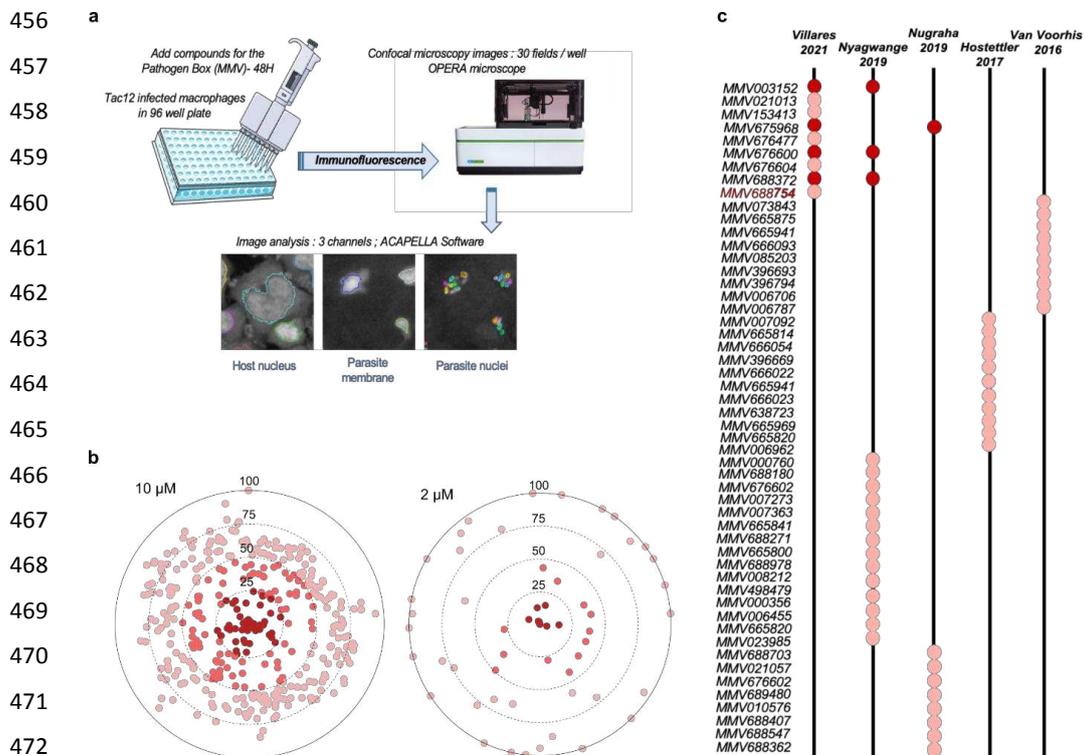
442 We thank members of the Weitzman laboratory for critical reading of the manuscript and invaluable
443 advice on this study and members of the UMR7216 for helpful discussions. We gratefully acknowledge
444 the Medicines for Malaria Venture (MMV, Geneva, Switzerland) for providing the MMV Pathogen Box
445 compound library. We thank G. Langsley (Institut Cochin, Paris, France) for the generous gift of TBL3,
446 BL3 and TpMD409 cells and K. Woods (University of Bern, Switzerland) for TaC12 cells. This work was
447 supported by the French National Research Agency (ANR PATHO-METHYLOME #ANR-15-CE12-0020),
448 the EUR G.E.N.E. (#ANR-17- EURE-0013), and the “Who Am I?” Laboratory of Excellence #ANR-11-
449 LABX-0071 funded by the French Government through its “Investments for the Future” program
450 operated by the ANR under grant #ANR-11-IDEX-0005-01, the Fondation ARC pour la Recherche sur le
451 Cancer (ARC n°155029). JBW is a senior member of the Institut Universitaire de France (IUF).

452

453 Competing Interests

454 All authors do not have any competing interests

455 **FIGURES**

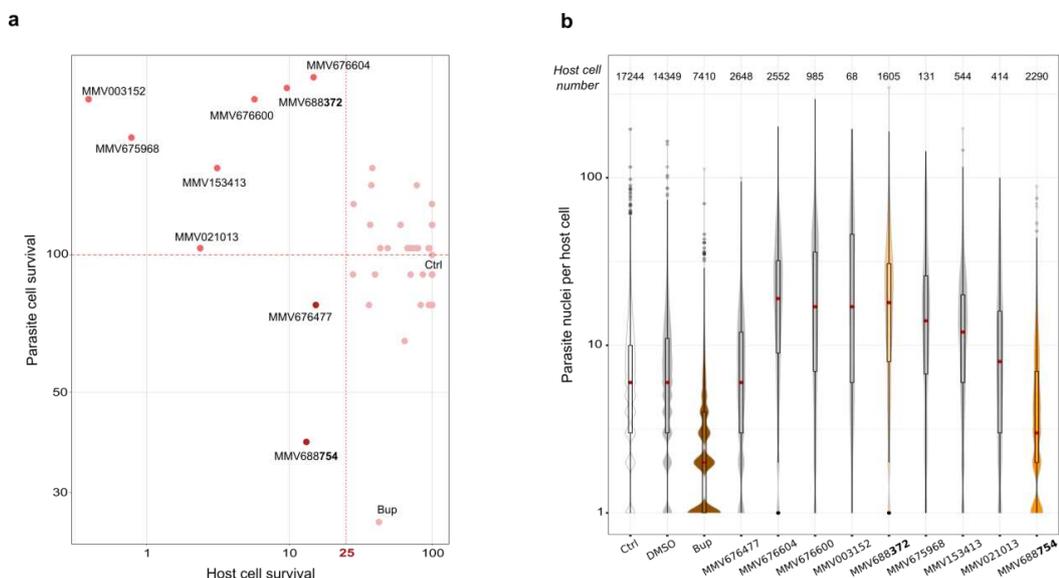


475 **Figure 1: Screening MMV Pathogen Box compounds against *Theileria*-infected macrophages**

476 **a.** A schematic presentation of the different steps of the microscopy-based drug screen. *T.*
 477 *annulata*-infected macrophages (TaC12 cell line) were distributed into 96-well plates and imaged after
 478 incubation (48 hours) with compounds from the MMV Pathogen Box library at two concentrations.
 479 The screen involved identifying and segmentation of host cell nuclei (DAPI staining), the macroschizont
 480 membrane (CLASP-GFP fusion protein) and parasite nuclei (H3K18me1 staining).

481 **b.** TaC12 cells treated with MMV Pathogen Box compounds at two concentrations (10 μ M or 2
 482 μ M) for 48 hours. Host cell survival was calculated by comparing the number of host cell nuclei per
 483 field with control (DMSO-treated) cells. Results are plotted for percent host cell survival, with the
 484 darkest spots representing compounds causing less than 25% survival.

485 **c.** Comparison of our results with previous MMV screening reports for *Theileria*-infected cells.
 486 The hit compounds from screens conducted against cells infected with *T. equi* (Van Voorhis *et al.*,
 487 2016⁴, Nugraha *et al.*, 2019²⁸), *T. parva* (Nyagwange *et al.*, 2019²⁶) or *T. annulata* (Hostettler *et al.*,
 488 2016²⁷) are indicated as circles. Hits detected in more than one screen are indicated in dark red.
 489 The complete list of compounds is shown in Supplementary Table 1.



490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512

Figure 2: Screening for impact on parasite and host cell survival

a. Bi-parametric dot plots showing the host cell and parasite survival as a percentage of DMSO-treated controls. Only two MMV compounds decreased host and parasite cell survival effectively, while the other 7 caused increased parasite numbers. This is probably due to the stress caused by drug cytotoxicity of host cells and the impact on parasites in the remaining surviving cells. The DMSO control (Ctrl) and Buparvaquone (Bup) data are shown for comparison.

b. Violin plots of the number of parasites per host cell. Data are shown for untreated, DMSO-treated, buparvaquone (Bup)-treated and hit compound-treated samples. Only one drug (MMV688754) showed a strong decrease in parasite number comparable to Buparvaquone treatment. The relative surviving host cell numbers are indicated above. The red dot represents the median number of parasites per surviving host cell. The Buparvaquone drug is shown in brown and the two compounds MMV688372 and MMV688754 used in subsequent experiments are coloured orange.

513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547

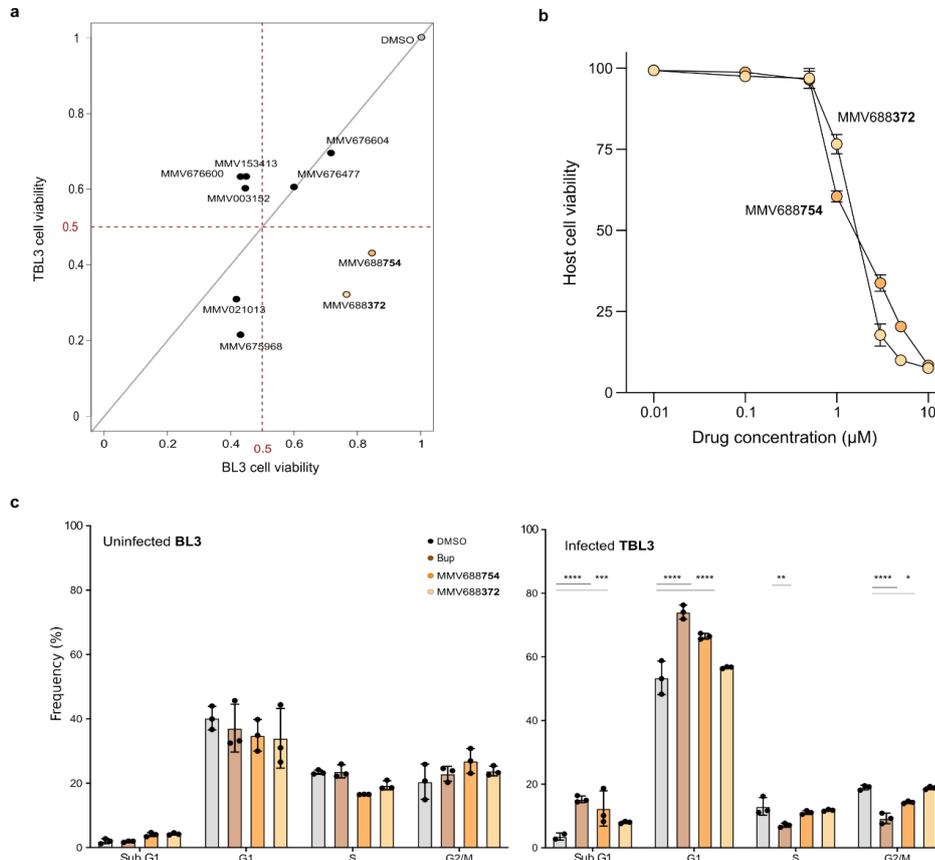


Figure 3: Comparing the drug impact on infected TBL3 vs uninfected BL3 cells

a. Bi-parametric dot plot showing the host cell viability in *Theileria*-TBL3 and uninfected BL3 cells with a 2 μM drug-treatment for 48 hours. Only two MMV drugs reduced TBL3 survival (less than 50%), but not BL3 cells (around 80% survival). Representative of three independent experiments.

b. Cytotoxicity over a range of drug concentrations for TBL3 infected cells. The IC₅₀ for both drugs MMV688754 and MMV688372 were around 2 μM. Error bars represent mean values ± SD (n = 3 replicates).

c. Cell cycle analysis by flow cytometry performed on BL3 and TBL3 cells following treatment with 2 μM drugs for 48 hours. Error bars represent mean values ± SD. n=3 independent experiments Two-way Anova statistical test, Dunnett's multiple comparison: *p<0.1 to ****p<0.0001.

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

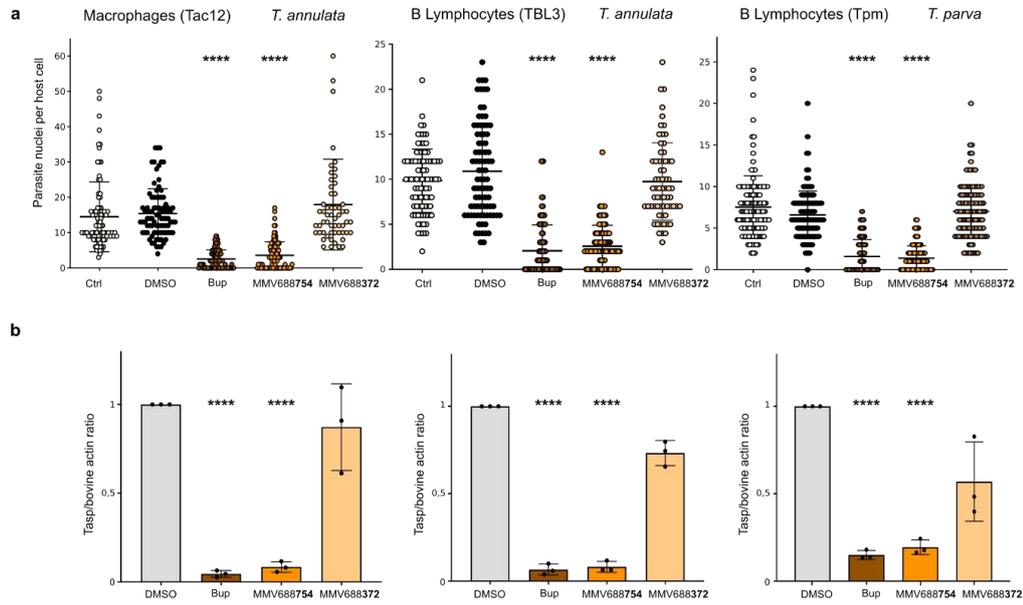


Figure 4: Drug effects on parasite number and gene expression in different parasite species and host cell types

a. Parasite load per infected host cell was evaluated after drug treatment (2 μ M for 48 hours) compared to untreated (Ctrl), Buparvaquone (Bup) or DMSO-treated cells. Host cells (at least n=50) were assessed for each experiment and parasite nuclei (DAPI staining) per host cell were counted manually. These results are representative of 3 independent experiments. One-way Anova statistical test, Kruskal Wallis non-parametric test multiple comparison: ****p<0.0001. Results are shown for *T. annulata*-infected macrophages (TaC12), B lymphocytes (TBL3) or *T. parva*-infected (TpM) lymphocytes.

b. Assessment of parasite viability using quantitative RT-qPCR analysis of parasite *TaSP* expression relative to bovine *actin* mRNA expression (host or parasite targeted first by the drug) in the three different cell lines compare to DMSO or Buparvaquone (Bup) treatment. Mean values \pm SD. One-way Anova statistical test, Dunnett's multiple comparison test: ****p<0.0001.

583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617

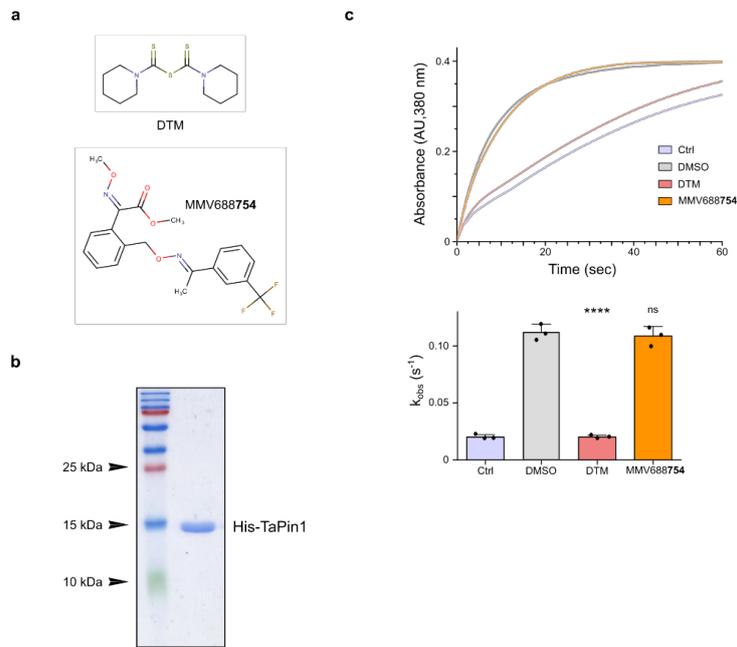


Figure 5: MMV688754 does not inhibit TaPin1 activity

a. Chemical structures of DTM (Pin1 inhibitor) and the test compound MMV688754.

b. Purification of recombinant His-tagged TaPin1 protein.

c. Inhibition assay showing that DTM alone inhibited TaPin1 prolyl-isomerase activity *in vitro*. TaPin1 (10 μ M) was incubated for 24 hours at 4°C degrees with 500 μ M DTM, MMV688754 or DMSO. Ctrl is without enzyme. Mixtures were diluted 1000-fold, and TaPin1 activity was assayed for one minute by reading the absorbance at 380nm. Apparent velocity constants (K_{obs}) were extrapolated from these curves. While DTM effectively inhibited TaPin1 activity, MMV688754 did not have any inhibitory effect. These results are representative of three independent experiments, which are shown quantitatively below. Mean values \pm SD. n=3 independent experiments. One-way Anova statistical test followed by Dunnett's multiple comparison test: ****p<0.0001.

618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652

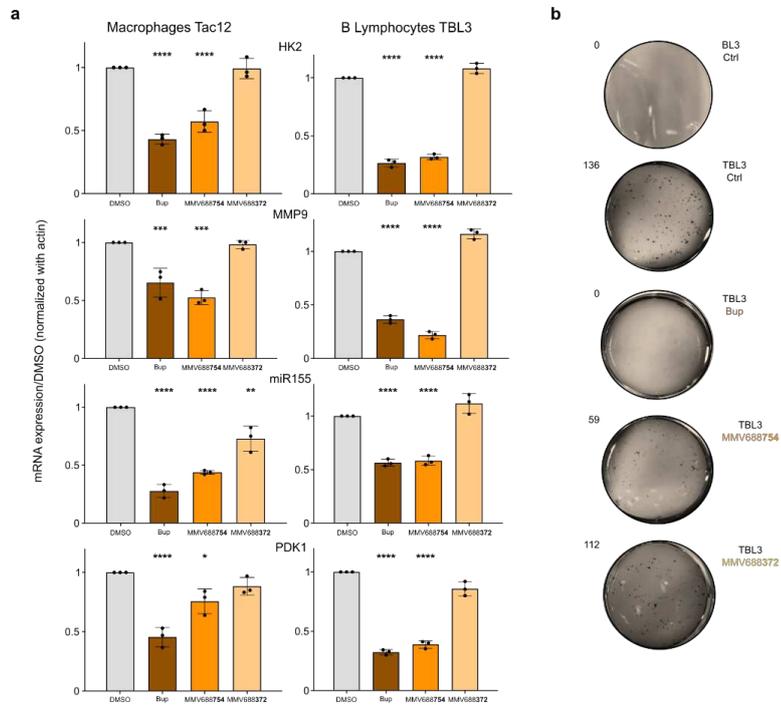


Figure 6: MMV668754/Trifloxystrobin inhibited the transformed phenotype

a. Infected macrophages (TaC12) or infected B lymphocytes (TBL3) were treated with the designated drugs MMV688754, MMV688372 or Buparvaquone (Bup) for 48 hours and key transformation associated genes were evaluated by qRT-PCR analysis compared to DMSO controls. The MMV668754/Trifloxystrobin and Bup treatment had equivalent inhibitory effects on bovine gene expression. Mean values \pm SD, standardized using bovine actin expression. $n=3$ independent experiments. One-way Anova statistical test, Dunnett's multiple comparison test: **** $p<0,0001$.

b. Soft-agar analysis demonstrated that the drug treatment also affecting the colony growth of TBL3 cells. The results shown are representative of two independent experiments.

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

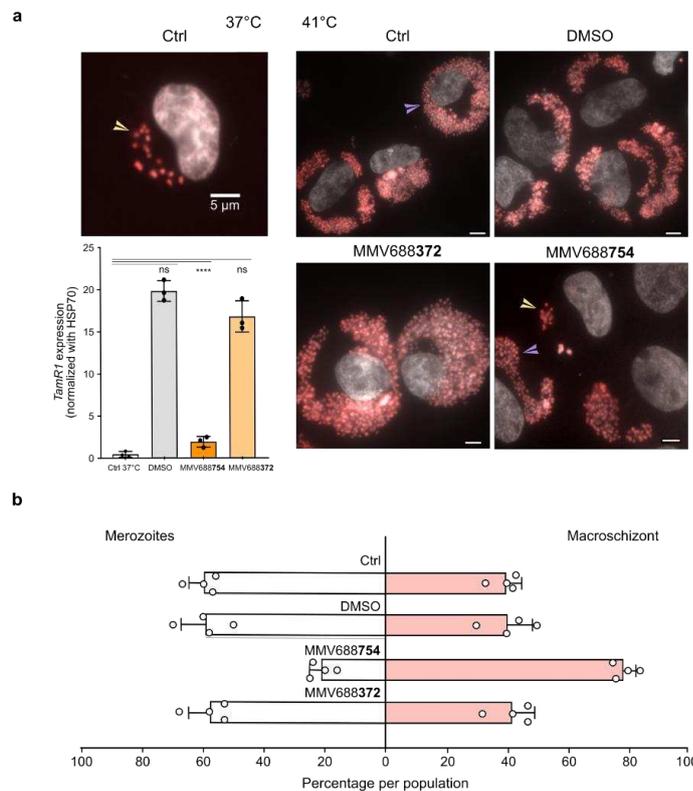
672

673

674 **Figure 7: MMV668754/Trifloxystrobin inhibited parasite differentiation to merozoites (merogony)**

675 a. TaC12 infected macrophages were incubated at 37°C or at 41°C for 8-10 days to induce
 676 merogony. Immunofluorescence with an antibody against H3K18me1 highlighted the parasite nuclei
 677 in the macroschizont stage (yellow arrowheads) and decreases upon differentiation, when host cells
 678 fill up with large number of parasites as they differentiate into merozoites (purple arrowheads).
 679 Treatment with MMV668754 blocked the merogony process. This was confirmed by qPCR expression
 680 analysis of the parasite *TamR1* gene, a marker of the merogony stage.

681 b. Quantification of the percentage of cells at the macroschizont or merogony stage after 8-10
 682 days in culture at 41°C, with or without MMV668754, or DMSO treatments. n=3 independent
 683 experiments (n > 50 cells). Mean values ± SD. Statistical test Dunnett's multiple comparison test: ns =
 684 not significant; ****p<0.001.



673

674 **Figure 7: MMV668754/Trifloxystrobin inhibited parasite differentiation to merozoites (merogony)**

675 a. TaC12 infected macrophages were incubated at 37°C or at 41°C for 8-10 days to induce
 676 merogony. Immunofluorescence with an antibody against H3K18me1 highlighted the parasite nuclei
 677 in the macroschizont stage (yellow arrowheads) and decreases upon differentiation, when host cells
 678 fill up with large number of parasites as they differentiate into merozoites (purple arrowheads).
 679 Treatment with MMV668754 blocked the merogony process. This was confirmed by qPCR expression
 680 analysis of the parasite *TamR1* gene, a marker of the merogony stage.

681 b. Quantification of the percentage of cells at the macroschizont or merogony stage after 8-10
 682 days in culture at 41°C, with or without MMV668754, or DMSO treatments. n=3 independent
 683 experiments (n > 50 cells). Mean values ± SD. Statistical test Dunnett's multiple comparison test: ns =
 684 not significant; ****p<0.001.

Compound (Plate_Well)	Survival % of DMSO < 25%		MMV	Compound name	Family
	10 μ M	2 μ M			
A_A11	3.6				
A_B11	3.2	18.4	MMV676477	CHEMBL2098184	TUBERCULOSIS
A_C04	3.1				
A_F04	2.9				
A_H09	6.3				
A_H11	5.4				
B_A11	9.8				
B_B03	10.8	17.7	MMV676604	AZD5438	KINETOPLASTIDS
B_C03	21.8	6.8	MMV676600	Danusertib	KINETOPLASTIDS
B_C11	4.27				
B_G06	4.9	0.4	MMV003152	Mebendazole	REFERENCE COMPOUNDS
B_G10	23.4				
B_H02	0.02				
B_H03	13.8				
B_H08	0.05				
C_A05	3.2				
C_A10	6.8				
C_C03	0.9				
C_D11	23.5				
C_E11	6.7				
C_F04	2.9				
C_F08	0.8				
C_F10	10				
C_G03	22.5				
C_G04	0.5				
C_G05	0.4				
D_A05	2.3				
D_B07	0.2				
D_B09	9.5				
D_B10	0.2				
D_D11	0.2				
D_E02	19.6				
D_E05	2.4				
D_F03	5.9				
D_F06	3.5				
D_F11	0.05				
D_G08	0.1	11.1	MMV688372	CHEMBL3115821	KINETOPLASTIDS
D_G11	8.9				
D_H09	1.1	0.9	MMV675968	CHEMBL88430	CRYPTOSPORIDIOSIS
E_D05	8.2				
E_E11	0.6	3.7	MMV153413	Thiophene-4	TUBERCULOSIS
E_F08	0.05				
E_G04	4.3	2.8	MMV021013	CHEMBL530275	TUBERCULOSIS
E_G06	9	15.9	MMV688754	Trifloxystrobin	KINETOPLASTIDS

Supplementary Table 1

Target genes	Primers sequence Forward	Primers sequence Reverse
Actin	GGCATCCTGACCCTCAAGTA	CACACGGAGCTCGTTGTAGA
Tasp	AGCAGCCCCTTGTCATGGG	TAATAGCTTTTGCACGGAGGA
MMP9	CCCATTAGCACGCACGACAT	CACGTAGCCCACATAGTCCA
HK2	CGACCAAGTGCAGAAGGTTG	CGTCTGGAGTAGACCTCAC
miR155	TGGCGCAAACCAGGAAGGGGA	ACAGCCCACAGCAAGCCTCC
PDK1	CTAGGCGTCTGTGTGATTTG	GATAGAGGTGGGATGGTAC
HSP70	ACGCAAATGGAATCCTCAAC	TATTCGTCGTGCTCTGCTAA
TamR1	CCACTCCTGTAGCGGGTAAA	TTGGGAGGTAAGTACTGACCCAAA

Supplementary Table 2

II- 3) Discussion additionnelle

II- 3) a. *MMV : une librairie en libre accès pour la découverte de nouvelles molécules*

Cette banque de composés libre accès, permet aux chercheurs du monde entier de tester des centaines de molécules sur leur agent pathogène d'intérêt et dans des conditions spécifiques à leur laboratoire. Les criblages microscopiques suivis d'une caractérisation phénotypique minutieuse sont une puissante stratégie de découverte de nouveaux traitements.

En effet, plusieurs études avec la Pathogen Box ont déjà été faites chez *Theileria*.¹⁵¹ Aucun composé n'est commun entre tous ces travaux, excepté avec certains de notre étude. Cela peut s'expliquer par différentes stratégies de criblages mais aussi par une trop grande dérive des cellules en culture entre les différents laboratoires. (cf Article Fig.1c)

Notre stratégie de criblage s'est basée sur la cytotoxicité des cellules infectées. Nous avons également quantifié la charge parasitaire par cellules hôtes, comparé leurs impacts sur les lignées cellulaires infectées et non infectées, et testé leurs effets sur différentes espèces de *Theileria*... La multiplicité des tests nous a permis d'élire un seul composé affectant uniquement les cellules infectées et ouvrant des perspectives encourageantes.

II- 3) b. *Le mode d'action de MMV668754 : un composé prometteur*

La recherche de nouvelles molécules anti-theileriales permet de pallier aux problèmes de résistance à la Buparvaquone. À la suite d'un criblage réalisé sur des macrophages infectés par *T. annulata* (Tac12), nous nous sommes focalisés sur des composés ayant les mêmes propriétés que la Buparvaquone : impactant spécifiquement la survie des cellules infectées. Les 400 composés de la « Pathogen Box » ont été testés à 10uM puis 2uM. À la concentration de 2uM, seuls 9 composés diminuent la survie des cellules infectées de plus de 75%. Nous avons également validé l'effet de ces composés sur d'autres types cellulaires : les lymphocytes B infectés TBL3 ou non infectés BL3 ; mais aussi sur une autre espèce : *Theileria parva* (Tpm).

Les autres critères de sélection ont été de déterminer :

- qui du parasite ou de l'hôte est impacté en premier lieu par le traitement ;
- l'effet sur le cycle cellulaire de l'hôte ;
- l'état de transformation des cellules hôtes ;
- l'impact sur la différenciation parasitaire.

Les effets du composé MMV668754 sont comparables à la Buparvaquone dans tous les tests fonctionnels. Cette molécule élimine prioritairement les cellules infectées provoquant un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose des cellules infectées. MMV668754 diminue la survie parasitaire avant celle de l'hôte, bloque la croissance des colonies en soft agar, et réduit l'expression de gènes bovins liés à la transformation, comme MMP9, miR-155 et HK2.⁵³ Nous avons également mis en évidence que ce composé bloque la différenciation des parasites en mérozoïtes de par sa diminution du nombre de parasites par cellules hôtes. Nous avons donc voulu déterminer si la cible de ce composé appelé MMV668754 ou Trifloxystrobine, est la même que celle de la Buparvaquone : TaPin1.

L'activité catalytique de la prolyl-isomérase TaPin1 est inhibée par la Buparvaquone, mais également par la DTM, un inhibiteur de Pin1 humain¹⁵². MMV668754 n'a eu aucun effet sur l'activité de TaPin1. Nous prédisons donc que MMV668754 inhibe un mécanisme alternatif qu'il serait intéressant de caractériser à l'avenir. La différence de cible entre MMV668754 et la Buparvaquone est d'autant plus intéressante car les phénomènes de résistance sont dus à des mutations de TaPin1.⁶⁴ Si TaPin1 était également la cible de MMV668754, ces mutations auraient pu rendre la Trifloxystrobine tout aussi inefficace que la Buparvaquone face à l'infection. Ici, même si TaPin1 est mutée dans certaines souches de *T. annulata*, MMV668754 pourra éliminer les cellules infectées.

Enfin, des lignées résistantes à la Buparvaquone ont déjà été utilisées au laboratoire.

Pour vérifier que la Trifloxystrobine ne cible pas TaPin1, il faudrait montrer que la Buparvaquone n'a aucun effet sur la survie parasitaire dans ces cellules mais qu'un traitement Trifloxystrobine entraîne toujours une forte diminution du nombre de parasites.

II- 3) c. Perspectives pour déterminer la cible de MMV668754

Au laboratoire, 33 protéines sécrétées par *T. annulata*, dont fait partie TaPin1, ont déjà été découvertes (cf Fig.22).⁵³ Comme la Trifloxystrobine semble avoir le même effet sur les cellules infectées que la Buparvaquone, il est possible qu'elle cible également l'une de ces protéines sécrétées. Nous pourrions essayer de faire un « docking » entre le composé et ces protéines afin de trouver une potentielle cible, mais également une technique de « Cellular Thermal Shift Assay » combinée à de la Spectrométrie de Masse.

Déterminer la cible de ce composé pourrait nous en apprendre davantage sur la façon dont *T. annulata* utilise la cellule hôte.

Gene Number	Name (Theileria GeneDB)
TA03310	DNA-directed RNA polymerase D subunit, putative
TA03950	50S ribosomal protein L12, putative
TA04155	2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase, putative
TA04440	U6 snRNA-associated Sm-like protein, putative
TA04940	tRNA nucleotidyltransferase, putative
TA07095	ClpB protein, putative
TA07825	Vacuolar H ⁺ -ATPase subunit, putative
TA09230	Glucose-inhibited division protein a-like protein, putative
TA09390	CLP protease, putative
TA09735	Methionyl-tRNA synthetase, putative
TA10275	GTP-binding protein/GTPase, putative
TA10875	Proteasome beta 3 subunit, putative
TA11230	Glycoprotease, putative
TA11325	Vacuolar proton-translocating ATPase, putative
TA11805	Erythrocyte membrane-associated malaria antigen-like
TA14270	50S ribosomal protein L22, putative
TA14275	Sodium/hydrogen exchanger, putative
TA14575	TatD-like deoxyribonuclease, putative
TA15545	Protein phosphatase 2c like, putative
TA16145	DnaJ-like molecular chaperone, putative
TA16525	Membrane protein, putative
TA16990	GTP-binding protein, LepA subfamily, putative
TA17315	Surface protein precursor (TaSP), putative
TA17385	Adp-ribosylation factor (ARF homologue), putative
TA17670	LytB protein, putative
TA18700	NEW1 domain containing protein isoform, putative
TA18945	Peptidylprolyl isomerase, putative – TaPin1
TA19160	Ubiquitin regulatory protein, putative
TA19195	Seryl-tRNA synthetase, putative
TA19600	Cyclophilin 1, putative
TA20240	Integral membrane protein, putative
TA20650	Aspartate transcarbamoylase, putative
TA20675	Thioredoxin-like protein, putative

Fig. 21 : Liste des potentielles protéines sécrétées de *T. annulata*. Ce parasite a environ 3792 protéines ; 689 d'entre elles contiennent un signal peptide. Ensuite, seules les protéines spécifiques à *T. annulata* et n'ayant pas d'orthologues dans les autres Apicomplexes ont été conservées. Parmi ces 138 protéines, les protéines hypothétiques, ou non exprimées au stade macroschizonte, ou ciblant l'apicoplaste du parasite, ont été éliminées. Ce pipeline a fourni cette liste de 33 protéines.

Nous avons déjà testé au laboratoire 26 dérivés de MMV668754 qui n'ont pas fourni de données similaires sur la survie de l'hôte ou du parasite. La génération de dérivés chimiques de la Trifloxystrobine reste une étape essentielle de l'optimisation du traitement avant la validation *in vivo*. La combinaison de MMV668754 et la Buparvaquone est une piste à explorer *in vitro* et *in vivo*. Cela pourrait rétablir l'efficacité des traitements en réduisant les risques de résistance aux médicaments et permettre l'éradication de l'infection.

Enfin, il a été décrit que la Trifloxystrobine agit en inhibant le transfert d'électrons dans les mitochondries, ce qui perturbe la voie respiratoire mitochondriale et le métabolisme de la cellule, empêchant donc la croissance des champignons¹⁵³.

Des études ont aussi montré l'effet cytotoxique de la Trifloxystrobine entraînant l'apoptose des cellules¹⁵⁴. Une piste à explorer est donc le mécanisme de mitophagie médiée par la Trifloxystrobine. La mitophagie est l'élimination par autophagie des mitochondries endommagées. Ce mécanisme pourrait peut-être expliquer l'impact de MMV668754 sur les cellules infectées. La mort cellulaire est plus prononcée au sein des cellules infectées (TBL3) par rapport aux cellules non infectées (BL3) ce qui pourrait se justifier par un nombre supérieur de mitochondries et une activité mitochondriale plus importante dans les cellules infectées.

T. annulata se sert aussi probablement des mitochondries de l'hôte pour produire l'énergie nécessaire à sa survie.

Nous pourrions nous intéresser à l'expression des gènes mitochondriaux, comme les marqueurs de mitophagie PINK1 et Parkin,¹⁵³ mais aussi élargir le panel de gènes impactés par la Trifloxystrobine et les comparer à l'effet de la Buparvaquone, grâce à un séquençage ARN. Cela nous permettrait de définir plus précisément l'action et même la cible de ce composé.

Grâce à l'étude précédente, nous avons pu utiliser H3K18me, comme marqueur parasitaire dans le criblage. L'immunofluorescence de H3K18me a permis de quantifier le nombre de noyaux parasites par cellules hôtes et sélectionner de nouveaux composés sur le critère de la survie parasitaire. Nous avons également pu étudier les niveaux de méthylation de H3K18me suite aux différents traitements mais ce paramètre a été davantage exploité dans le second criblage. Ce premier criblage microscopique a été une preuve de concept pour le second criblage fait sur une librairie « d'inhibiteurs d'enzymes épigénétiques ».

Criblage 2

III- Caractérisation d'un nouvel antiparasitaire prometteur : MC2646

III- 1) Criblage d'inhibiteurs d'enzymes épigénétiques

III- 1) a. Un criblage centré sur l'épigénétique de l'interaction hôte-pathogène

Nous avons montré précédemment (cf Résultats partie I) que la monométhylation de la lysine 18 sur l'histone H3 (H3K18me1) était une modification dynamique et spécifique du parasite au stade de schizonte et qu'elle disparaissait lors du passage en mérogonie (phase de multiplication active du parasite). Ainsi, pour souligner l'importance de l'épigénétique au sein des interactions hôte-pathogène et de l'infection, nous avons réalisé un criblage « d'inhibiteurs d'enzymes épigénétiques » qui sont en réalité des inhibiteurs d'enzymes responsables des modifications post traductionnelles.

Nous avons utilisé la même méthodologie de criblage mise en place précédemment (cf partie II- a. 1) mais en tirant avantage cette fois-ci de la signature biochimique dynamique de H3K18me1. En effet, en plus de la survie parasitaire nous avons mesuré par immunofluorescence les niveaux de monométhylation de H3K18 suite aux différents traitements. L'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes épigénétiques, dans un contexte de cellules infectées et transformées, est très pertinente au vu du rôle majeur de ces enzymes dans les processus cancéreux et infectieux.

Types d'inhibiteurs	Nombres d'inhibiteurs
DNMT	26
GST	3
HAT	5
HDAC	23
HDM (Jumonji)	4
HDM (LSD1)	42
HKMT (Ezh2)	2
HKMT(G9a/GLP)	3
PRMT/HKMT	4
SIRT	33
Pan demethylase	4

Table 1 : Composition de la librairie d'inhibiteurs d'enzymes enzymatiques.

La banque de composés utilisée pour cette étude provient du Département de Chimie et technologies pharmaceutiques du Professeur Antonello Mai, à l'Université Sapienza de Rome. Cette librairie est composée de 150 inhibiteurs d'enzymes épigénétiques ayant des cibles différentes (histones ou ADN) (cf Table.1).

De façon intéressante, certains de ces inhibiteurs font partie d'essais cliniques en cancérologie (cf Intro II-3), nous avons donc testé leurs effets sur le caractère transformant des cellules infectées par *T. annulata*. Contrairement au criblage réalisé dans la Partie II des résultats, l'objectif dans cette partie, repose sur l'identification de molécules ayant un effet uniquement sur la survie parasitaire sans affecter la cellule hôte.

III- 1) b. Sélection et identification des meilleurs candidats

L'analyse du criblage s'est concentrée sur les 3 critères d'intérêt suivant : la survie de l'hôte, la survie du parasite et les niveaux de méthylation après traitements.

Nous avons trois contrôles pour nous aider à déterminer l'effet des composés :

- une condition non traitée appelée Ctrl, nous montre le niveau basal de méthylation de H3K18me dans les cellules infectées ainsi que le nombre moyen de parasites par cellules hôtes.
- le composé Buparvaquone, qui diminue le nombre de parasites et la survie de la cellule hôte, sans affecter le niveau de méthylation (cf Fig. 24).
- le composé TCP, qui est l'inhibiteur d'histone déméthylase utilisé dans l'étude précédente (cf Résultats partie I), pour moduler la méthylation de H3K18me1. Nous avons montré qu'il n'impacte ni le nombre de parasites, ni la survie de l'hôte mais augmente le niveau de méthylation de H3K18me.

Suite à l'analyse des résultats du criblage, nous avons pu remarquer que les composés MC2645, MC2646 et MC3205 affichent les phénotypes recherchés, c'est à dire une forte diminution du nombre de parasites par cellules hôtes, sans impacter la survie de la cellule hôte, et sont associés à une augmentation du profil de monométhylation de H3K18.

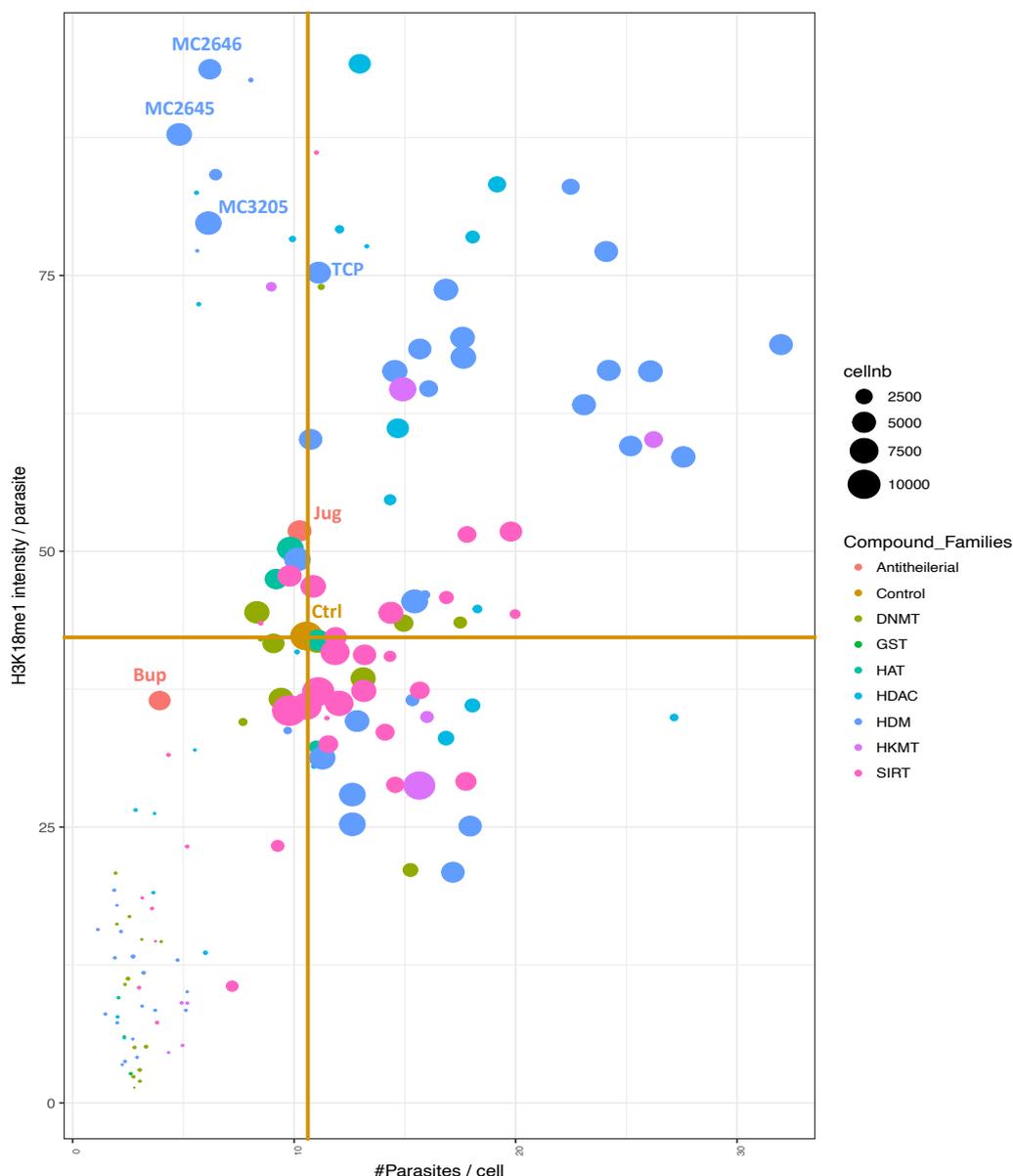


Fig. 22 : Criblage microscopique d'inhibiteurs d'enzymes épigénétiques sur des *Tac12* traitées avec $10\mu\text{M}$ d'inhibiteur pendant 48 heures, dans des plaques à 96 puits. Ce graphique représente le nombre de parasites par cellules hôtes par rapport à leur niveau de méthylation de H3K18me1. La taille des cercles correspond au nombre de cellules. La Buparvaquone, dans la partie en bas à gauche, diminue la survie parasitaire mais n'impacte pas la méthylation de H3K18me. TCP est en haut à droite, il augmente la méthylation de H3K18 mais le nombre de parasites par cellules hôtes est quasi équivalent à la condition contrôle (Ctrl). Les composés en haut à gauche ont augmenté la méthylation de H3K18me et le nombre de parasites par cellule hôte a fortement diminué. Les trois hits ont été choisis car en complément des deux autres effets, ils n'impactaient pas la survie de la cellule hôte.

Ces trois composés sont caractérisés comme des inhibiteurs de lysine déméthylase (KDM). Ils sont dérivés de l'inhibiteur de déméthylase TCP, qui est caractérisé comme un inhibiteur de LSD1¹⁵⁵. Les composés MC2645 et MC2646, possèdent des structures presque identiques ou seul l'emplacement d'un cycle les différencie (*pour des raisons de propriétés intellectuelles en vue d'un dépôt de brevet nous ne pouvons divulguer leurs structures*).

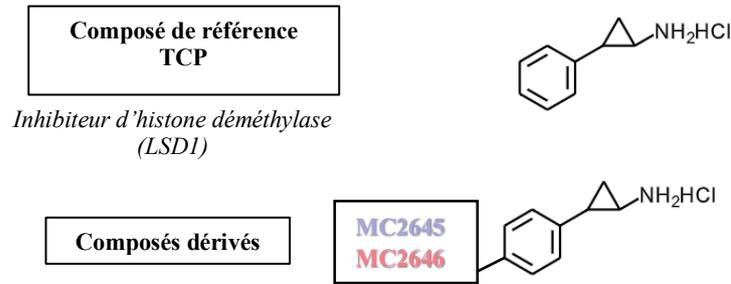


Fig. 23 : Structures du composé TCP et ses dérivés, les deux hits MC2645 & MC2646.

Nous nous sommes concentrés sur les composés MC2645 et MC2646 qui, à une concentration de 10 μ M durant 48H, réduisent de moitié la survie de l'hôte, exactement comme la Buparvaquone.

Les profils de distribution du nombre de parasites par cellules hôtes sont également très similaires entre la Buparvaquone et MC2645-MC2646 : ils entraînent la mort parasitaire. Cette distribution est assez uniforme dans les cellules contrôles non traitées, où l'on peut observer entre 10 et 12 parasites par cellules hôtes. Après les traitements, le profil de distribution est plus hétérogène, le composé atteint certaines cellules et d'autres semblent y résister.

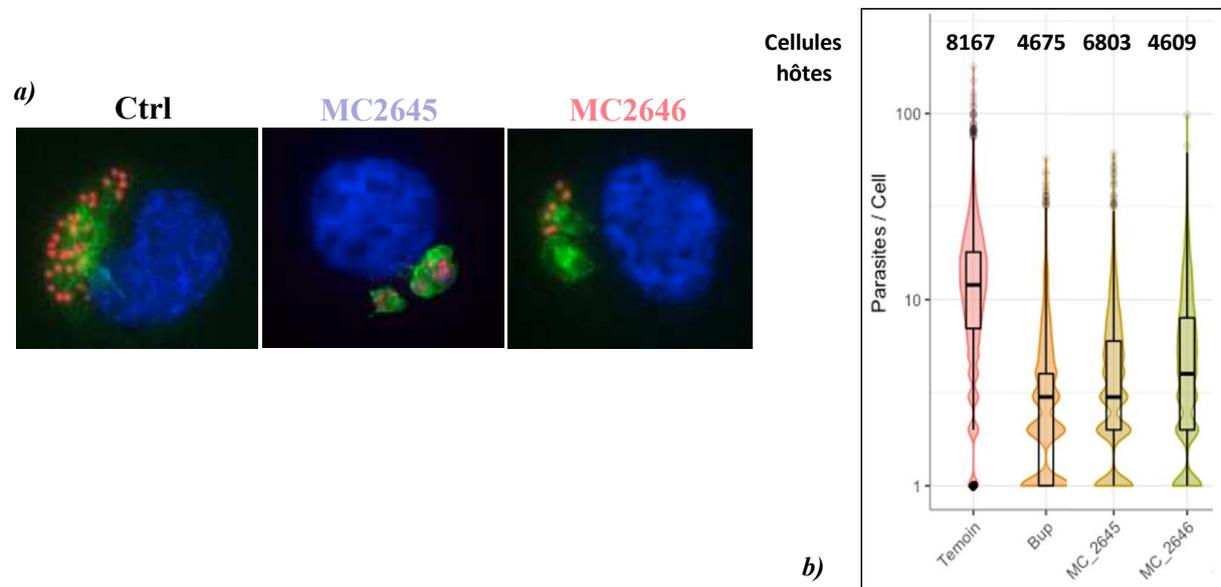


Fig. 24 : Résultats du criblage sur la survie parasitaire de MC2645-MC2646.

a) Images extraites du criblage, associées aux traitements MC2645 et MC2646. Le bleu correspond au DAPI, le vert au schizonte marqué en GFP et l'immunofluorescence de H3K18me est en rouge.

b) « Violin plot » représentant le nombre de parasites par cellules hôtes sous différents traitements. La largeur du tracé représente la distribution des cellules associées à une quantité de parasite. La boxplot représente la médiane du parasite par cellules hôtes. Les témoins sont des macrophages infectés, non traités (Tac12). Bup (Buparvaquone) est le contrôle positif, connu pour réduire le nombre de parasites. MC2645 et MC2646 diminuent le nombre de parasites par cellules hôtes autant que la Buparvaquone.

Ces deux composés inhibiteurs de KDM, bloquent efficacement la survie du parasite. Nous avons validé ces hits grâce à différentes techniques. Ces résultats encourageants renforcent cette approche de criblage pour caractériser de nouveaux traitements anti-theileriaux ciblant la machinerie de méthylation.

III- 2) Validation des 2 composés prometteurs : MC2645 & MC2646

III- 2) a. Validation de la cytoxicité parasitaire :

Dans un premier temps, nous avons voulu valider manuellement les résultats obtenus par le criblage sur la survie parasitaire et celle de la cellule hôte. Pour le criblage, la concentration choisie de 10 μ M était élevée, comparée aux concentrations d'utilisation de ces petites molécules. Le but était d'être le plus discriminant possible et de faire ressortir les composés entraînant des phénotypes clairs sur la survie parasitaire. Pour confirmer leurs effets à des concentrations moindres, nous avons réalisé une gamme de concentration allant de 0,01 μ M à 10 μ M de MC2645 et MC2646 et avons traité les cellules pendant 48 heures. Une diminution significative du nombre de parasites par cellules hôtes est observée à partir de 1 μ M, aussi nous avons décidé de travailler à cette concentration 10 fois inférieure à celle du criblage mais qui donne malgré tout un phénotype très clair sur la survie parasitaire. Cette concentration a donc été utilisée pour la suite des expériences.

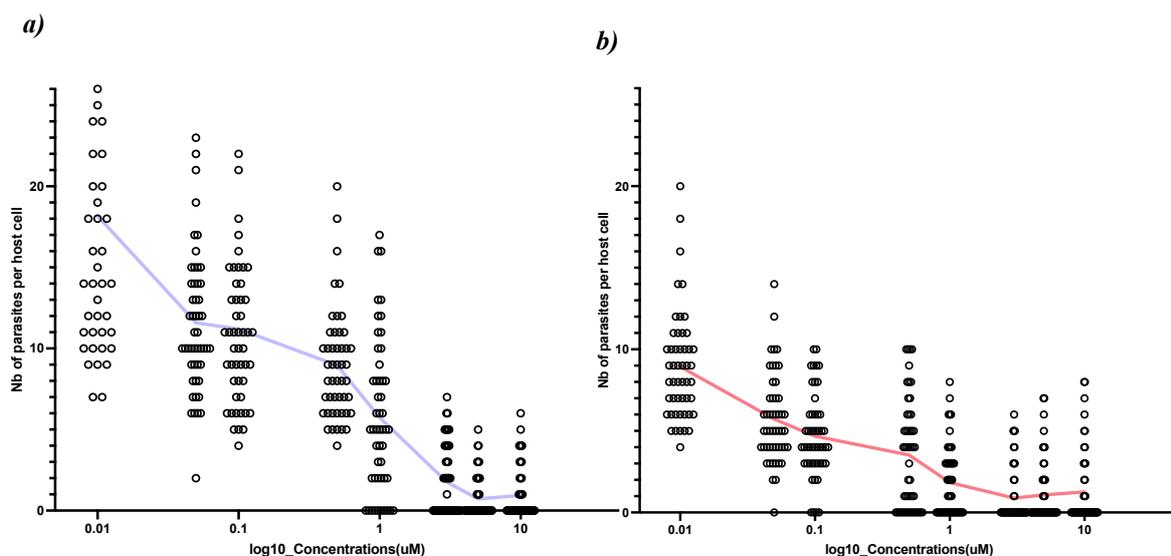


Fig. 25 : Gamme de concentration de MC2645 (a) et MC2646 (b). N=50 cellules comptées par concentration

III- 2) b. L'effet de MC2645 et MC2646 est indépendant du type cellulaire

Nous avons traité des macrophages infectés (Tac12), des lymphocytes B infectés par *T.annulata* (TBL3) et également une autre espèce de *Theileria*, *T.parva* (Tpm) à 1µM de MC2645-MC2646 durant 48 heures pour confirmer l'effet de ces molécules dans d'autres lignées infectées. MC2645 et MC2646 diminuent très significativement le nombre de parasites par cellules hôtes dans tous les types cellulaires (cf Fig.28 a/b) : il y a une dizaine de parasites par cellules hôtes dans la condition contrôle non traitée, et environ 3-4 parasites par cellules hôtes après traitement MC2645-2646, ce qui est équivalent à la Buparvaquone.

Pour déterminer si le composé cible en premier le parasite ou la cellule hôte, nous avons mesuré par PCR Quantitative l'abondance du gène parasitaire Tasp et celui de l'Actine bovine. Le ratio de ces 2 gènes permet de déterminer si l'hôte ou le parasite est prioritairement ciblé par un composé. Un faible ratio signifie que le gène parasitaire diminue avant le gène bovin, et que le parasite est impacté avant l'hôte, c'est le cas après un traitement Buparvaquone et MC2645-MC2646. En revanche, pour le traitement Tétracycline qui tue la cellule hôte, ce ratio est élevé car cette molécule affecte prioritairement le gène bovin (cf Fig.28 c.)^{151,156}

III- 2) c. MC2645 et MC2646 n'impactent pas la survie et le cycle cellulaire de l'hôte

Pour déterminer si MC2645 et MC2646 impactaient la survie et le cycle cellulaire de l'hôte, les cellules ont été traitées toutes les 48H pendant une semaine, avec ces deux composés ainsi que la buparvaquone, notre contrôle. La Buparvaquone tue spécifiquement les cellules infectées par *T. annulata* dès 2 jours de traitement, à la différence des composés MC2645-MC2646 qui n'impactent pas la survie de la cellule hôte infectée (TBL3), même après une semaine de traitement (cf Fig.29 a/b) . Pour étudier l'impact des composés sur le cycle cellulaire de la cellule hôte, nous avons utilisé du iodure de propidium afin de marquer l'ADN des cellules infectées et non infectées. La Buparvaquone entraîne un arrêt du cycle en G1 dans les cellules infectées contrairement aux traitements MC2645-2646 qui n'impactent pas le cycle cellulaire. Aucun de ces 3 composés n'impacte la viabilité ou le cycle cellulaire des cellules non infectées par *T. annulata* (BL3), laissant penser que le parasite ou des mécanismes associés à l'infection sont ciblés (cf Fig.29 c.).

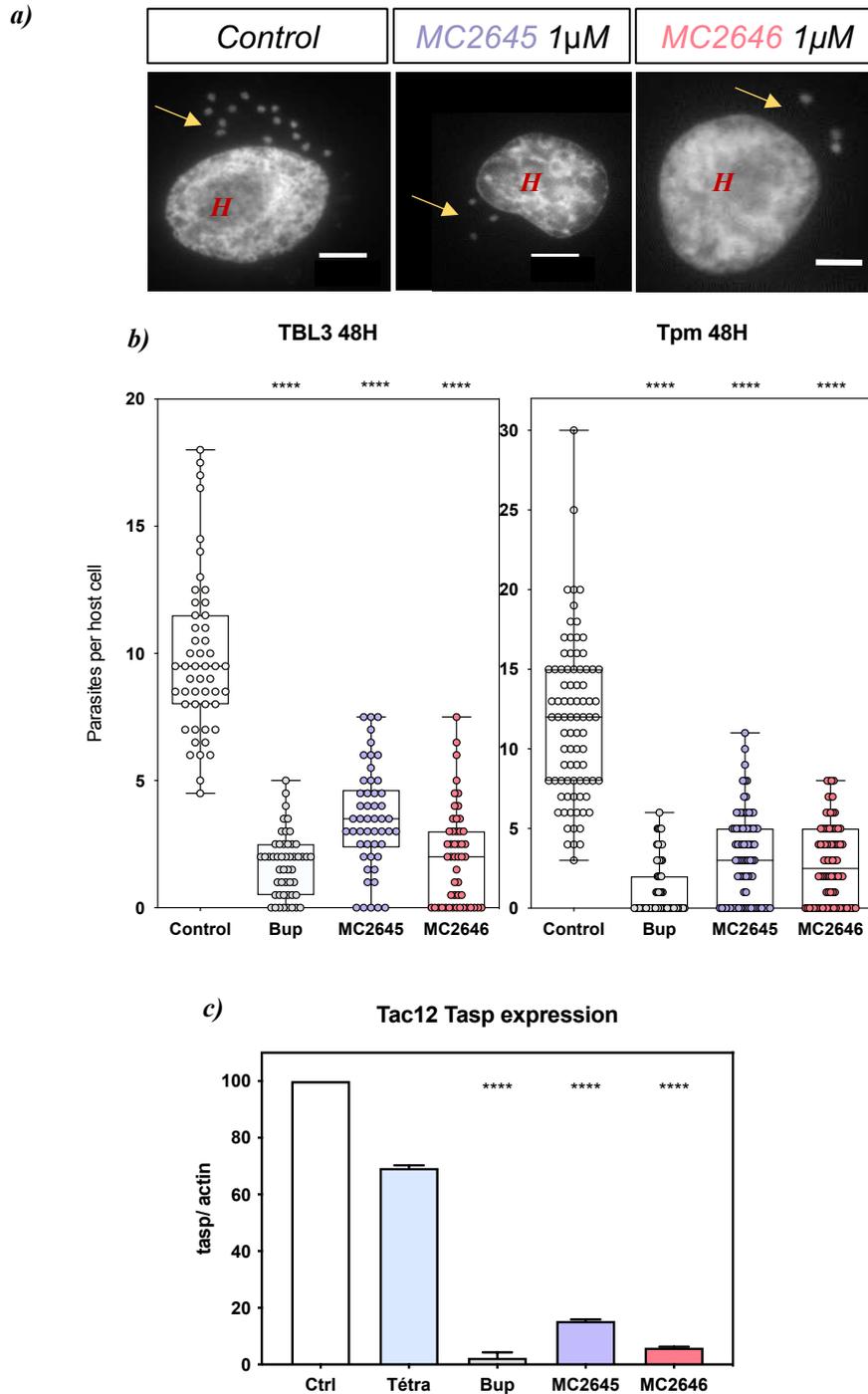


Fig. 26 : Effets de MC2645 et MC2646 sur la survie parasitaire.

a) Images de cellules, marquées en DAPI, représentatives de l'effet des composés MC2645-2646 sur la survie parasitaire ayant permis de faire les comptages suivants. Le noyau de la cellule hôte est indiqué par un H rouge et les noyaux parasites par une flèche jaune. Scale bar = 5 µm.

b) Graphique du nombre de parasites par cellules hôtes dans des Lymphocytes B infectés (TBL3) et des Lymphocytes T infectés par *Theileria parva* (Tpm) après traitement Buparvaquone à 50 ng/ml et MC2645-2646 à 1µM-48H. N=50.

c) Représentation du ratio entre Tasp/Actine bovine suite à une qPCR sur des macrophages infectés Tac12 (Tétracycline 20µM). Réplicats biologiques et test de significativité : Dunnett's multiple comparison test , **** $p < 0,0001$

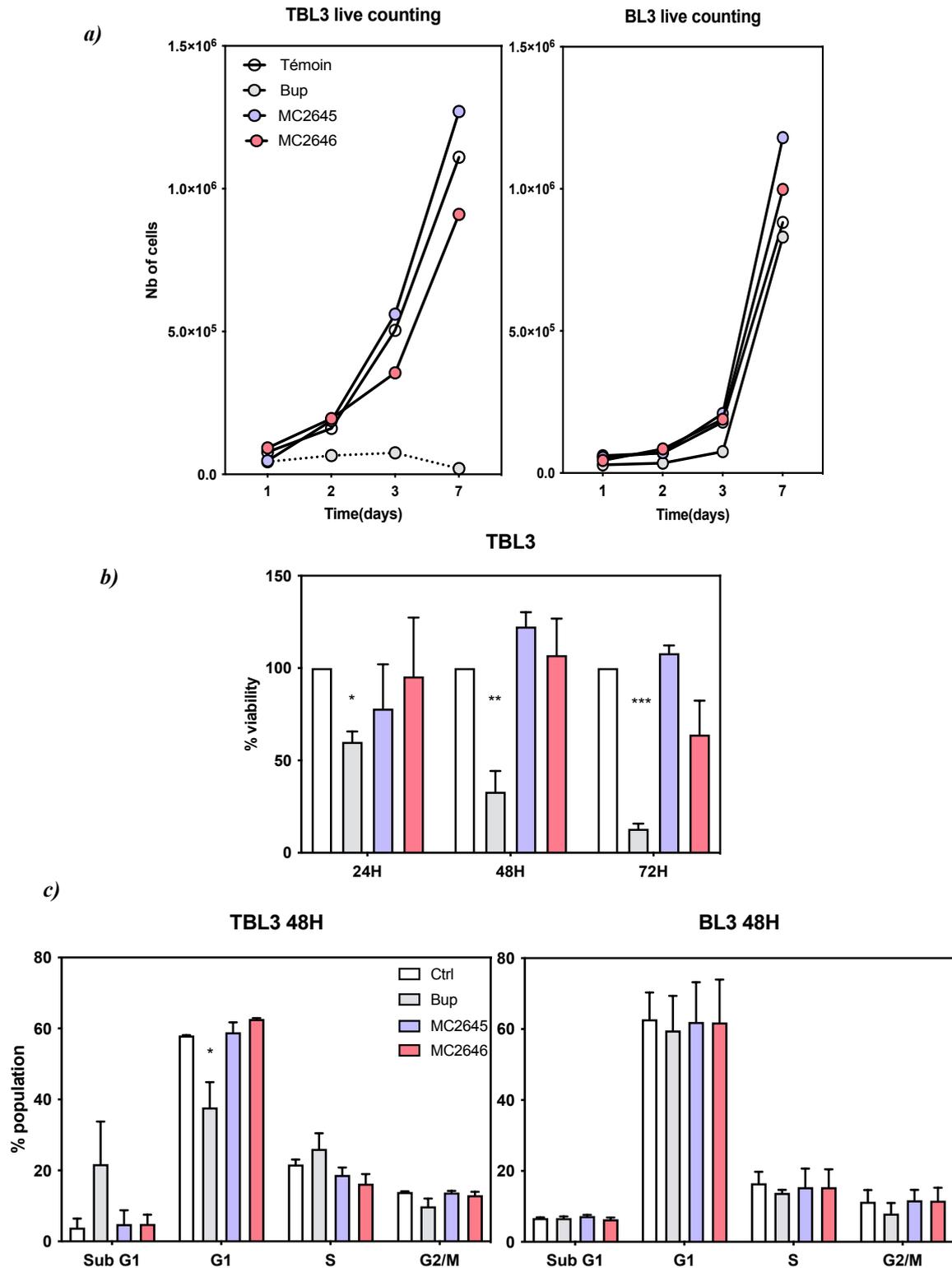


Fig. 27 : Effets de MC2645-MC2646 sur la survie et le cycle cellulaire de l'hôte.

a) Graphique représentant la viabilité des cellules TBL3 et BL3 à différents temps pendant une semaine. Ce comptage de cellules vivantes a été réalisé grâce à un protocole utilisant du bleu de Trypan.

b) Graphique du pourcentage de viabilité sur 72H des cellules infectées TBL3. N=2 2-way Anova Dunnett's multiple comparaison test. * $p=0,0455$, ** $p=0,0017$, *** $p=0,0002$

c) Graphique du pourcentage de population pour chaque phase du cycle cellulaire. Analyse du cycle cellulaire hôte après traitement Bup (Buparvaquone, 50ng/ml) et MC2645-264 à $1\mu\text{M}$, 48H. N=2, résultats significatifs sous 2-way Anova Dunnett's multiple comparaison test. * $p=0,0389$

III- 2) d. Les deux composés inhibent le passage en mérogonie

Dans le but d'étudier l'effet de MC2645-MC2646 sur le cycle de vie parasitaire, nous avons réalisé une batterie de tests similaires au « Criblage 1 » (cf partie II). Nous avons montré dans l'article Partie Résultats I-2, que le composé TCP, en augmentant la méthylation de H3K18me, bloque le passage en mérogonie. Ici, nous observons également une diminution de l'expression de TamR1, gène marqueur de cette étape du cycle parasitaire, corrélée avec l'augmentation du nombre de cellules restées au stade schizonte après 8-10 jours à 41°C. Les deux composés empêchent donc les cellules infectées de passer à l'étape d'après du cycle parasitaire, cela est probablement dû à la diminution du nombre de parasites mais également à l'augmentation du niveau de H3K18me1 qu'ils entraînent.

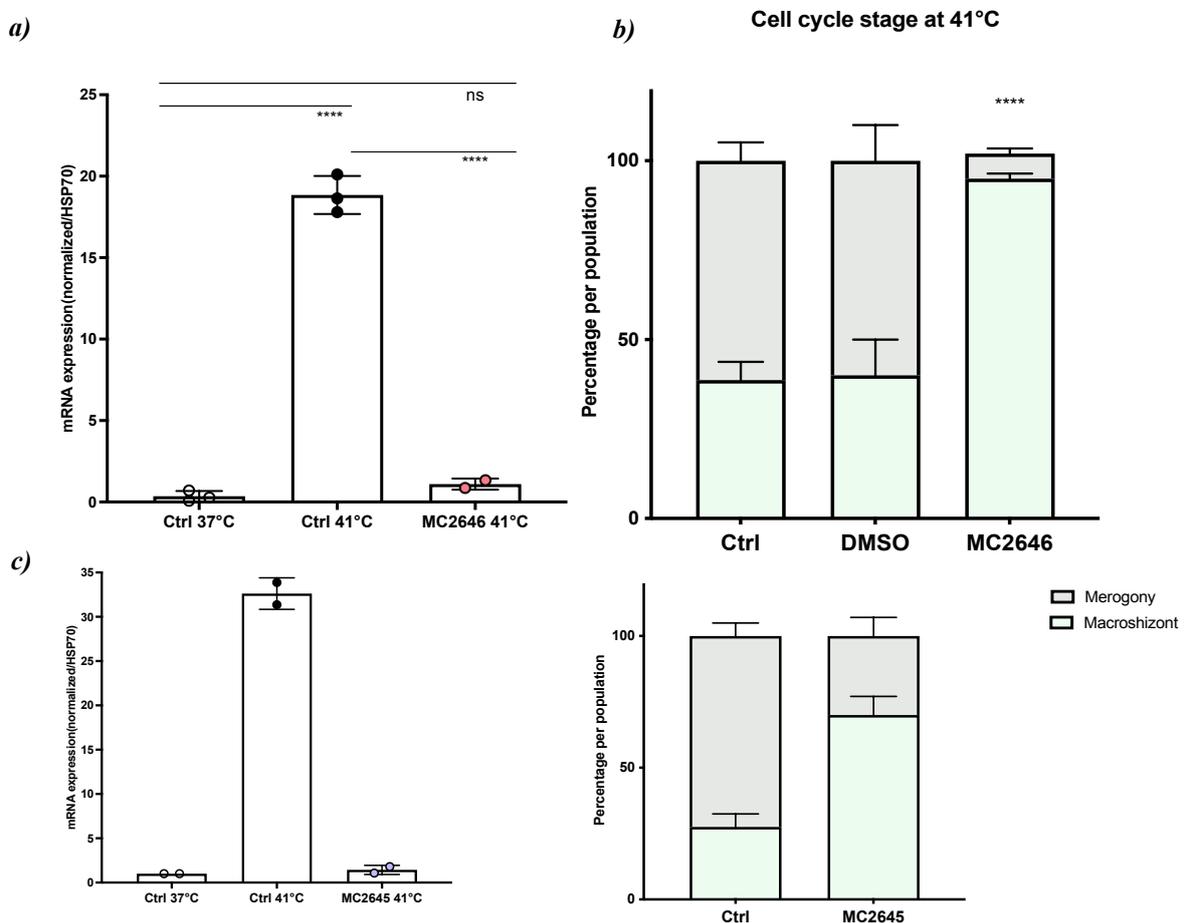


Fig. 28 : Effets de MC2645-MC2646 sur le cycle de vie parasitaire.

a) Représentation des niveaux d'expression du gène parasitaire *TamR1*, marqueur de mérogonie, après 8 jours à 41°C et traitement avec MC2646 tous les 3 jours (simultanément au changement de milieu). Conditions comparées à un Ctrl schizonte à 37°C. b) Quantification des cellules au stade parasitaire macroshizonte (vert) ou mérogonie (gris) après 8 jours de culture à 41°C. N=2 expériences biologiques indépendantes, les barres d'erreur représentent les médianes +/-SD. Résultats significatifs sous 2-way Anova Dunnett's multiple comparaison test. **** $p < 0,0001$. Les expériences de MC2645 et MC2646 n'ont pas été faites simultanément, empêchant une représentation commune. Cependant, la même tendance est observée pour les deux (c).

III- 2) e. MC2645 et MC2646 impactent le caractère transformant de l'hôte

Pour déterminer le caractère transformant des cellules hôtes traitées avec MC2545 et MC2646, nous avons mis en place une expérience de croissance en milieu semi-solide (expérience en soft agar). En effet, les cellules non infectées BL3 n'ont pas la capacité de former des colonies, à la différence des cellules infectées TBL3 où elles sont nombreuses et témoignent du caractère transformant. Nous avons testé la capacité de MC2645 et MC2646 à bloquer la prolifération des cellules hôtes. Le contrôle positif Buparvaquone tue les cellules infectées empêchant toute formation de colonies. Après le traitement avec MC2645, la croissance des cellules est réduite mais un certain nombre de colonies est tout de même observé. Par contre, l'ajout de MC2646 affecte de manière importante la formation de colonies ; cependant, il reste des cellules vivantes contrairement à la Buparvaquone, mais elles ne sont plus en amas.

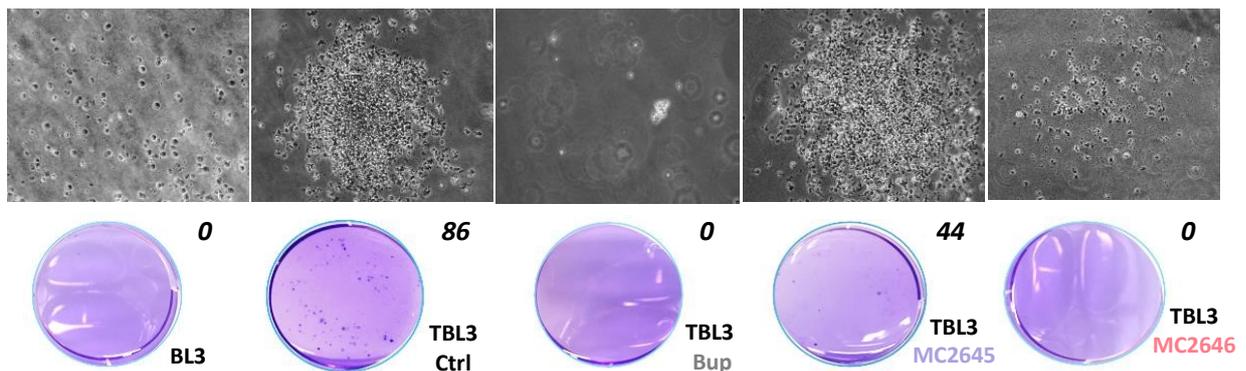


Fig. 29 : Effets de MC2645-MC2646 sur la transformation cellulaire. Essais de formation de colonies sur gélose molle avec des lymphocytes B infectés et non infectés sous différents traitements.

Condition Ctrl=non traité ; Bup = 50ng/ml ; MC2645& MC2646 à 1 μ M tous les 3 jours avec le changement de milieu. Le nombre correspond aux colonies comptées. N=2

Conclusion : Sélection de MC2646 comme un candidat prometteur

MC2645 et MC2646 sont les premiers composés décrits chez *T. annulata* qui à l'inverse de la Buparvaquone ne tuent pas la cellule hôte et semblent cibler uniquement le parasite. MC2646 diminue la survie parasitaire sans impacter celle de la cellule hôte, ni son cycle cellulaire ; il bloque le cycle de vie du parasite et diminue le caractère transformant des cellules hôtes sans pour autant les tuer.

Cela remet en question le dogme de dépendance de la cellule infectée envers le parasite, où la mort de ce dernier causerait automatiquement la mort de la cellule hôte. MC2646, contrairement à MC2645, diminue également le caractère transformant, nous nous sommes donc focalisés sur ce dernier afin de déterminer sa cible et son mode d'action. MC2646 pourrait être utilisé comme un futur anti-theilerial, mais aussi nous en apprendre plus sur les processus essentiels de l'infection et de la transformation de la cellule hôte.

III- 3) Le phénotype de MC2646 n'est pas associé à l'histone déméthylase LSD1

Nous avons voulu tester si le phénotype de MC2646 sur les cellules infectées était causé par l'inhibition de LSD1. LSD1 déméthyle spécifiquement la marque H3K4me2 et également H3K9me3, il a à la fois un effet co-activateur et un co-répresseur de l'expression des gènes. Dans un premier temps, nous avons voulu caractériser l'effet de MC2646 sur la cible histone de LSD1 : H3K4me2. Nous avons donc traité des cellules avec TCP, utilisé en contrôle positif, et MC2646, puis observé les niveaux globaux de méthylation de H3K4me2 par immunofluorescence. Tout comme TCP, les cellules traitées avec le composé MC2646 affichent un niveau de méthylation de H3K4me2 plus élevé (cf Fig. 32a). Lors du criblage, MC2646 a augmenté de façon très importante la marque H3K18me1. Des western blot de H3K4me2 et H3K18me1 soutiennent l'augmentation du signal obtenu en IF, mais il faudrait y ajouter un marqueur de la charge parasitaire afin de les rendre interprétables. (Résultats non présentés)

Si le phénotype causé par MC2646 est dû à une inhibition de LSD1, alors l'absence de la protéine LSD1 devrait phénocopier le traitement par MC2646. Nous avons réalisé une perte de fonction de LSD1 grâce à un siARN, afin de caractériser son impact sur la survie parasitaire et valider son effet sur H3K4me2 (cf Fig.32b). La perte de fonction de LSD1 diminue le nombre de parasites, par rapport à la transfection du contrôle (siLuc), environ 6-7 parasites par cellules hôtes, mais cette diminution n'est pas comparable à celle entraînée par MC2646 (cf Fig.32c). Les problèmes de transfection rencontrés, la technique d'électroporation utilisée et les westerns blot de validation qui ont suivi, ont donné des résultats très variables entre les nombreux réplicats pouvant expliquer ce phénotype intermédiaire. De plus, nous n'avons pas le moyen de savoir si dans la cellule où les parasites sont comptés, la protéine LSD1 est encore active ou non.

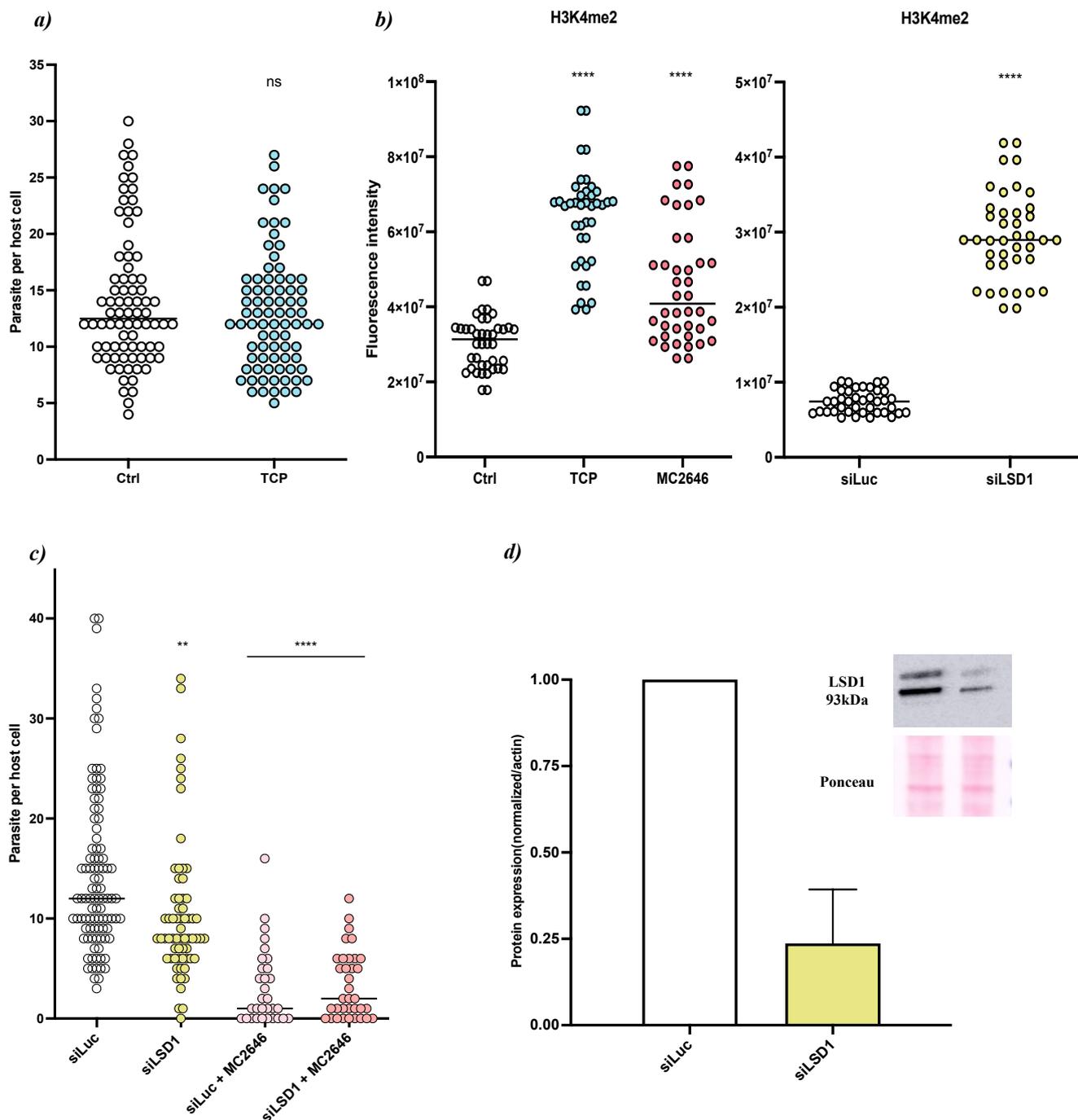


Fig. 30 : Impact sur la survie parasitaire d'une délétion de LSD1.

a) Quantification du nombre de parasites par cellules hôtes après traitement TCP. $N > 50$

b) Quantification de l'intensité de fluorescence de H3K4me2 des cellules infectées TBL3 dans la condition Ctrl=non traitée, TCP & MC2646 48H à $1\mu\text{M}$; et siLuc vs siLSD1, 48H après la transfection. $N > 30$ Résultats significatifs sous Dunnett's multiple comparaison test. **** $p < 0,0001$ et Kolmogorov-Smirnov test $p < 0,0001$

c) Graphique du nombre de parasites par cellules hôtes après 3 différents siLSD1 : Bov(bovin), H1(humain), H2(humain) ; puis combinés à un traitement MC2646 $1\mu\text{M}$ 48H. $N > 30$ Résultats significatifs sous Dunnett's multiple comparaison test. ** $p < 0,0081$ **** $p < 0,0001$

d) Western blot et quantification des siARN montrant une forte efficacité du siARN envers LSD1.

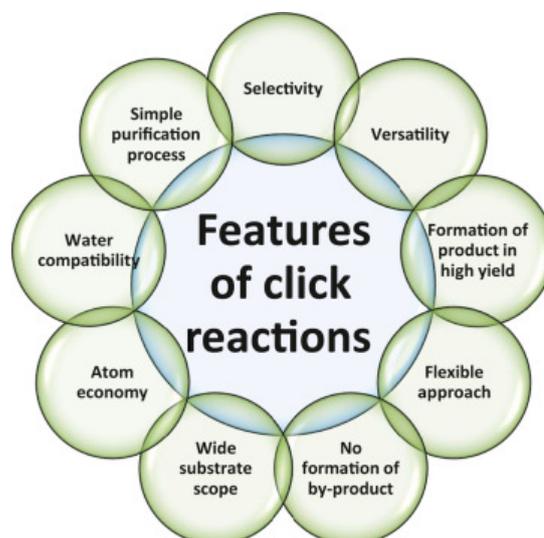
Dans un second temps, nous avons voulu vérifier si LSD1 pouvait être la cible de MC2646 responsable du phénotype. En effet, si c'était le cas en absence de LSD1, MC2646 ne devrait plus avoir d'effet sur la survie parasitaire. Nous avons donc combiné la perte de fonction de LSD1 à un traitement MC2646 et compté le nombre de parasites par cellules hôtes. Même en l'absence (partielle) de LSD1, MC2646 impacte toujours autant la survie parasitaire. Le phénotype entraîné par MC2646 n'est donc pas lié directement ou uniquement à son effet inhibiteur sur LSD1 (cf Fig. 32c). Cette piste étant déjà confortée par l'absence totale d'impact de TCP sur la survie parasitaire malgré un effet clair sur la méthylation (cf Fig. 32a et Résultats I). Il est possible que le composé MC2646 inhibe LSD1 d'une manière différente que TCP : par exemple, il pourrait cibler l'amino-oxydase de *T. annulata*. La détermination d'une cible et d'un mode d'action de MC2646 sont donc une question prioritaire : pour y répondre, nous avons utilisé une nouvelle technologie au croisement entre chimie et biologie.

III- 4) Recherche de la cible de MC2646 : nouveau composé anti theilerial

III- 4) a. Description de la technique innovante de « Click chemistry »

La « click chemistry » a trouvé de plus en plus d'applications notamment dans la découverte de nouveaux médicaments et de leurs cibles. Elle a été introduite en 2001 par le prix Nobel de chimie, Barry Sharpless comme « outil de conception de nouvelles entités moléculaires ». ¹⁵⁷ Les réactions chimiques de la click chemistry sont rapides, très sélectives, n'existent pas dans la « nature ». ¹⁵⁸ Dans notre cas, la réaction se fait entre un azide et une alkyne en présence d'un catalyseur, le Cuivre, ce qui va donner naissance à une troisième structure, un triazole : c'est une réaction CuAAC, pour Copper(I)-catalysed Alkyne-Azide Cycloaddition.

Fig. 31 : Caractéristiques principales des réactions utilisant la « chimie click ». Figure extraite du livre « Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science », Chapitre 2- « Click chemistry : A tool for green chemical organic synthesis »



L'alkyne est ajoutée au composé étudié et l'azide va être associé soit à un composé fluorescent Alexa fluor 488/594 pour visualisation de la cible du composé *in vivo*, soit à une Biotine pour réaliser un « pull-down » après liaison Streptavidine. (cf Mat&Meth)

Les composants de la réaction sont de petits groupements alkyne ou azide qui sont ajoutés à la molécule étudiée sans changer sa conformation ou modifier son effet et accessibilité à la cible. Cette technique nous permet de :

- visualiser la localisation cellulaire du composé ;
- identifier les cibles protéiques ciblées au sein d'une cellule ;
- détecter l'emplacement du composé dans le génome (pour les composés ciblant des protéines nucléaires).

La click chemistry a déjà été utilisée pour déterminer la cible d'un inhibiteur épigénétique à bromodomaines BET, sa localisation dans la cellule puis plus précisément sur le génome en associant la réaction de Click à une technique de Chip.¹⁵⁹

III- 4) b. Utilisation de la « Click chemistry » pour localiser le composé dans les cellules

Nous avons tout d'abord caractérisé la localisation du composé, chez l'hôte et/ou le parasite. Le composé MC2646 combiné à une alkyne, permettant de réaliser la réaction de « click », s'appelle MC4404. (cf Mat&Meth) Après la réaction de Click, il y a formation d'un triazole entre l'alkyne et l'azide, lié à un marqueur fluorescent permettant d'observer l'emplacement de la cible. Le composé MC4404 est létal sur les cellules hôtes après quelques heures de traitement. Nous l'avons donc utilisé en tant que marqueur cellulaire, à la manière d'un anticorps. Les cellules sont traitées ou non avec MC2646 pour obtenir un phénotype puis MC4404 est ajouté durant 30 minutes afin de voir la localisation de la cible du composé dans les deux conditions. La réaction de click se fait sur lame une fois les cellules fixées, perméabilisées et bloquées.

- Dans un premier temps, nous avons déterminé la localisation du composé et de sa cible, sur le panel de cellules utilisées au laboratoire : Tac12, TBL3, BL3, et également Hela (lignée cancéreuse humaine). Le profil de la localisation du composé est très différent entre ces 4 types cellulaires (cf Fig. 34). En effet, dans les cellules infectées macrophages (Tac12) comme les lymphocytes B (TBL3), la cible se trouve au niveau du parasite et plus précisément à côté des noyaux parasitaires.

Le signal fort et spécifique n'est pas retrouvé à côté de tous les noyaux parasitaires. Ce résultat ne nous laisse pas penser que la cible est une enzyme responsable de modifications post traductionnelles (comme LSD1), que ce soit chez le parasite ou chez le bovin, le signal étant absent dans les noyaux des deux organismes. Concernant les cellules non infectées par *T. annulata*, les lymphocytes B (BL3), le signal est cytoplasmique et composé de petits points mais aussi de structures plus grandes et très rondes. Ce même type de profil est obtenu dans les cellules cancéreuses humaines Hela où des vésicules très rondes et bien déterminées sont retrouvées dans le cytoplasme.

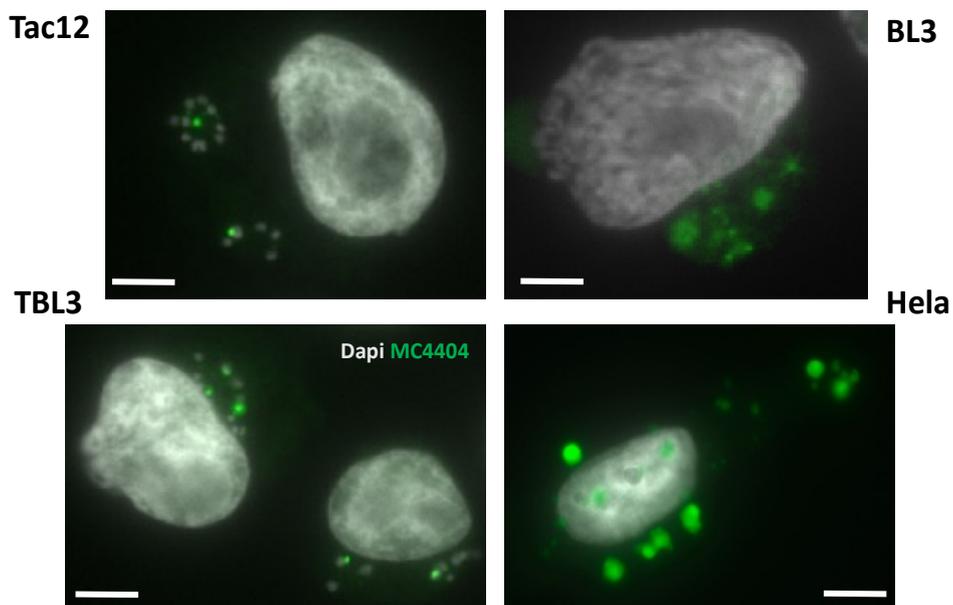


Fig. 32 : Cible du composé MC2646 dans les cellules infectées par *T.annulata*, Tac12 et TBL3 ; ou non infectées, BL3. Des cellules Hela ont aussi été utilisées pour caractériser la spécificité de la cible : il y a un signal dans tous les types cellulaires, bien que différent en présence de *Theileria*. Scale bar =5 μ m et 2 μ m pour les BL3. MC4404, incubé 30min avec les cellules puis après fixation, marqué en vert (Azide-Alexa Fluor 488) par la réaction de click.

La cible du composé étant retrouvée dans des lignées cellulaires non infectées par *T. annulata*, nous avons émis l'hypothèse qu'elle pourrait être une protéine hôte séquestrée par *T. annulata*.

- Dans un second temps, nous avons réalisé la même expérience mais en traitant les cellules 24H à 4 μ M de MC2646, puis en ajoutant MC4404 30min avant de récupérer les cellules. Le signal change complètement après le traitement MC2646. En effet, la cible du composé est retrouvée autour de ce qu'il reste de parasite, formant comme un anneau, ou une bague autour de ces derniers. Ce profil de signal est très clair, et extrêmement reproductible.

Les parasites se sont tous regroupés formant un amas de noyaux et la protéine cible de MC2646 semble les avoir enfermés dans une vésicule circulaire avec un point plus concentré. Le traitement TCP (10 μ M, 24H) n'entraîne aucune modification du signal de MC4404, qui reste à côté des noyaux parasitaires. Les traitements Buparvaquone et MC2645 donnent des résultats variables : certaines cellules conservent des points autour de ce qu'il reste de parasite, mais dans d'autres cellules où il n'y a plus de parasite, MC4404 est relâché dans le cytoplasme.

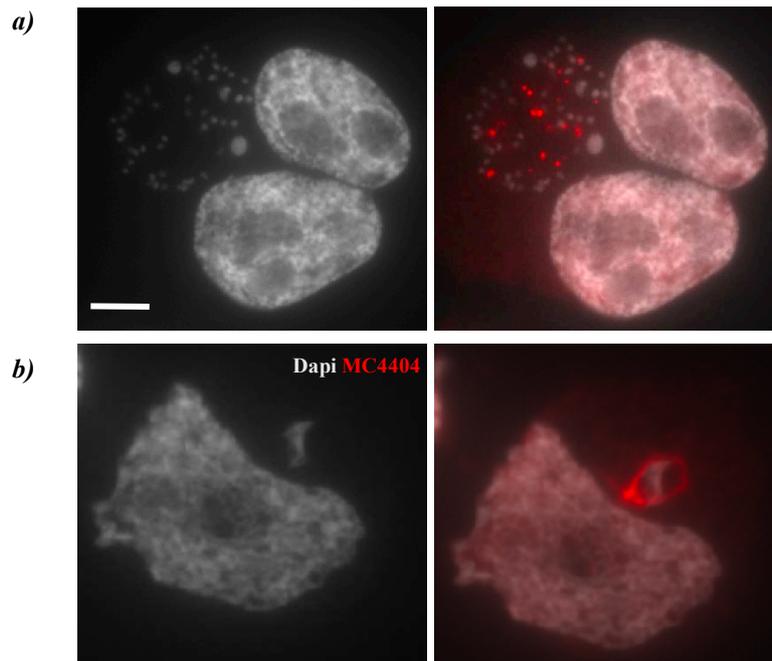


Fig. 33 : Effet du traitement MC2646 sur sa cible.

a) Images représentant des cellules infectées TBL3 en condition Contrôle ; puis b) traitées avec MC2646. Le signal click de MC4404 est en rouge : à côté des noyaux parasitaires pour la condition Ctrl et en forme de bague autour de ce qu'il reste de parasite après traitement MC2646. Scale bar = 5 μ m.

III- 4) c. Vérification de la spécificité du composé Click MC4404

Avant d'aller plus loin dans la caractérisation de ce composé, il a fallu vérifier la spécificité de MC4404 en démontrant que sa cible était identique à celle de MC2646. Nous avons traité simultanément les cellules durant 1H, afin de réaliser une compétition entre les deux composés : à concentrations égales, cinq fois plus (5 μ M) et dix fois plus (10 μ M) de MC2646 que de MC4404. Lorsque le composé parent, MC2646 est mis en excès, il y a une perte du signal à côté des noyaux parasitaires de MC4404. Le composé clické reste dans le cytoplasme, étant dans l'impossibilité de rejoindre sa cible, déjà saturée par MC2646.

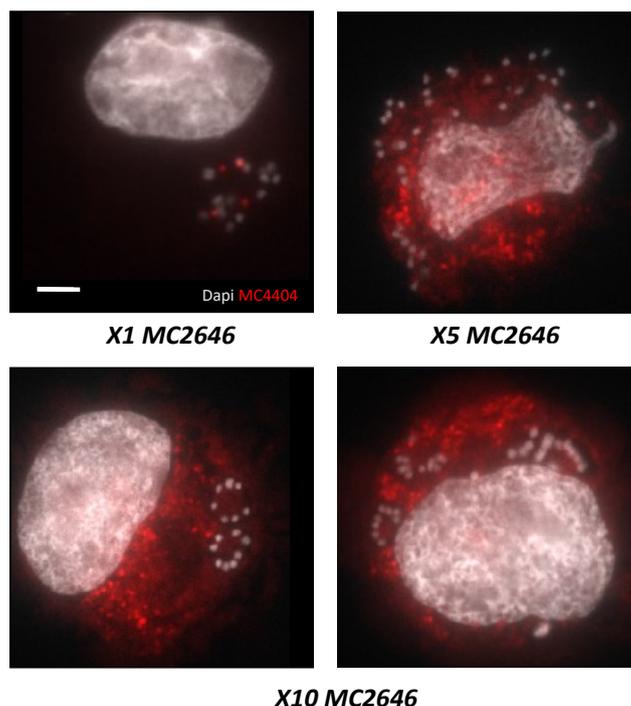


Fig. 34 : *Compétition entre le composé parent et « click ». Images représentant des cellules infectées TBL3 après différentes concentrations de MC2646 : 1 μ M, 5 μ M et 10 μ M et une concentration constante de MC4404 à 1 μ M. MC4404 marqué en rouge (Azide-Alexa Fluor 594) par la réaction de click. La délocalisation de MC4404 s'explique car sa cible est saturée par le MC2646 en excès. Scale bar =5 μ m.*

Il est fort probable que MC2646 et MC4404 aient la même cible. Le signal MC4404 est resté à côté des noyaux parasites après traitement avec MC2645, TCP et Buparvaquone en excès. Afin d'être certain que ce signal est spécifique au composé MC2646, nous avons testé un dérivé de TCP associé à une alkyne permettant de faire une réaction de Click chemistry. Le TCP-click a un profil très diffus, que ce soit dans les cellules infectées et non infectées, des vésicules rondes sont observées, comme dans les BL3 avec MC4404. En aucun cas le signal ne ressemble à celui MC4404 à côté des noyaux parasites des cellules infectées. De plus, le signal de TCP-click colocalise avec LSD1 après immunofluorescence ; ce qui n'est pas le cas pour MC4404.

III- 4) d. Caractérisation de la cible de MC2646 par Spectrométrie de Masse

Afin de chercher la cible protéique de MC2646, nous avons réalisé une expérience de « Pull-down » du composé MC4404, en utilisant une Azide-Biotine puis des billes aimantées couplées à la Streptavidine (cf Mat&Meth).

Suite à de nombreux tests de pull down avec le composé MC4404 combinés à des gels d'électrophorèse coloré au Nitrate d'argent, nous nous sommes interrogés sur l'interaction covalente entre le composé et sa cible. Nous avons donc fait synthétiser un composé MC2646 à la fois « clickable et photocrosslinkable » afin de sceller l'interaction entre le composé et sa protéine cible après exposition UV. Ce composé se nomme MC4564.

Nous avons défini 3 conditions pour l'expérience de Spectrométrie de Masse sur les macrophages infectés par *T. annulata*, Tac12 :

- des cellules traitées avec le composé MC2646, 1H à 10 μ M, qui, n'étant pas « clickable » ne devrait pas permettre d'attraper la cible du composé, seulement du bruit de fond, c'est notre contrôle négatif ;
- des cellules traitées avec le nouveau composé appelé MC4564, 1H à 10 μ M, qui donneront les potentielles cibles du composé ;
- des cellules traitées 1H avec 10 μ M de MC4562 et 50 μ M de MC2646, pour créer une condition de compétition et d'augmenter la sélectivité des potentiels candidats.

La réaction de click chemistry se faisant avec une Azide-Biotine-Fluo, cela nous a permis après un pull down Streptavidine associé à des billes aimantées, de détecter par fluorescence sur gel si notre expérience avait fonctionné avant de l'utiliser en Spectrométrie de masse.

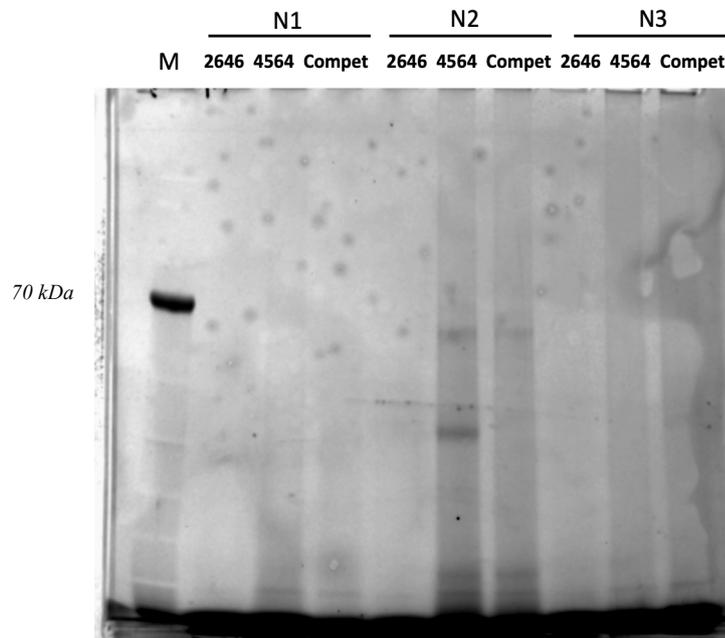


Fig. 35 : Pull down du composé pour déterminer sa cible. Gel acrylamide 4-12% Bis-Tris représentant le triplicat du pull down utilisé pour l'expérience de Spectrométrie de masse. Comme attendu, aucune bande n'est observée au niveau du dépôt MC2646 ; les bandes les plus marquées sont dans la MC4564 et elles sont présentes, bien que plus faibles, dans la condition de compétition. M = marqueur de poids ; N= répliquats

Un peu plus de 1900 protéines ont été obtenues après Spectrométrie de masse des échantillons, il a donc fallu exercer un tri des données :

- nous avons gardé toutes les protéines avec une pvalue < 0,05 ;
- nous avons éliminé les protéines qui ont été trouvées comme les plus enrichies dans la condition MC2646 ;
- nous avons supprimé les protéines qui étaient les moins enrichies dans les conditions MC4564 et Compétition.

Cela nous a donné une liste de 146 protéines et donc de nombreuses pistes à explorer. Parmi cette liste aucune protéine parasitaire n'a été retrouvée. (cf Tableau Annexe 2)

Nous nous sommes concentrés sur les protéines les mieux classées en fonction de leur pvalue, du nombre de peptides, de la valeur correspondant à la « puissance » proche de 1, qui pouvaient avoir un lien avec l'infection ou la tumorigénèse. Cela nous a permis de sélectionner une vingtaine de protéines à étudier en priorité.

Table 2 : Sélection de protéines cibles candidates du composé MC2646 suite à l'expérience de Spectrométrie de Masse

Protéines candidates	Rôle
<i>Complément C3 / Complément facteur B / C4b binding protein</i>	Activateur de l'autophagie
<i>Apolipoprotéines A / C / E</i>	Activateur ou inhibiteur de l'autophagie
<i>Protéine 14-3-3 theta/beta/alpha</i>	Régulateur de l'autophagie
<i>eIF5a</i>	Activateur de l'autophagie
<i>Importin 5 / 7</i>	Régulateur autophagie et cancer
<i>SEC63</i>	Régulateur autophagie et cancer
<i>Poly(rC)-binding protein 1</i>	Régulateur autophagie et cancer
<i>Clusterin</i>	Régulateur autophagie et cancer
<i>NFKB proto-oncogene / NFKB2</i>	Régulateur autophagie et cancer
<i>MAP4</i>	Cancer et division cellulaire
<i>IRF4</i>	Activateur autophagie et réponse immunitaire
<i>Annexin</i>	Régulateur de l'autophagie
<i>Peroxiredoxin</i>	Activateur autophagie et réduit cancer
<i>Thioredoxin</i>	Régulateur de l'autophagie

Cette liste de protéines correspond aux potentielles cibles pouvant être impliquées dans l'élimination du parasite. Les points communs qui ressortent entre toutes ces protéines appartiennent aux processus cellulaires de l'autophagie, de la cancérogénèse, ainsi qu'à la réponse immunitaire, et aux transferts inter-membranaires ou vésiculaires.

III- 4) e. Candidats prioritairement étudiés

Nous avons décidé d'étudier en priorité les protéines pouvant avoir un rôle majeur dans l'interaction hôte-pathogène. Parmi les meilleurs hits des protéines obtenues par le pull down du composé se trouvent les Apolipoprotéines et la protéine du Complément C3. L'isoforme du Complément C3a est situé à la membrane parasitaire en condition Contrôle, non traitée et ne colocalise pas avec le click qui est à côté des noyaux parasitaires. Par contre, après traitement MC2646, le signal de click et celui de C3a semblent se situer aux mêmes endroits. La colocalisation n'est pas parfaite, car le signal de C3a, bien que plus concentré au parasite, reste assez diffus.

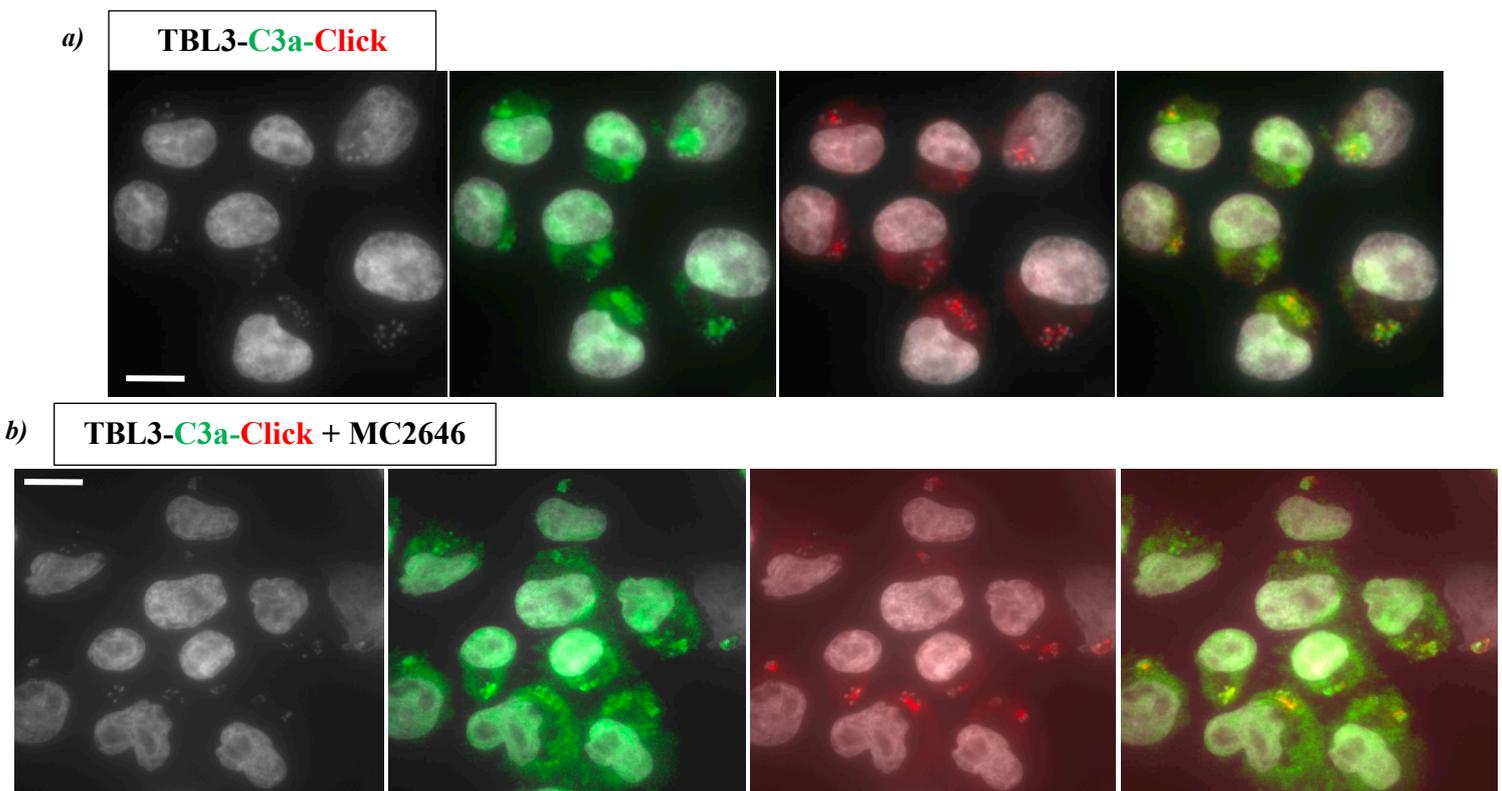


Fig. 36 : Validation du candidat Complément C3. Expériences d'immunofluorescences de C3a(vert), combinées au composé clickable MC4404(rouge). a) Condition contrôle b) Condition traitée MC2646. Après traitement, il y a une colocalisation, imparfaite des deux signaux. Scale bar =10 µm.

Par la suite, nous avons croisé les résultats de Bio-Id /IP de Clasp1 et CD2AP réalisés par Kerry Woods⁵⁷, avec les potentielles protéines cibles de MC2646 provenant du PD-MS. Plusieurs protéines sont communes aux deux listes, incluant la protéine 14-3-3 ou Importine5 : elles peuvent être la cible du composé MC2646 et également séquestrées par le parasite. C'est aussi le cas de eIF5a, un facteur d'initiation de la traduction eucaryote sur lequel nous avons décidé de nous concentrer.

III- 5) eIF5a : une potentielle cible de MC2646, actrice de l'autophagie

III- 5) a. Détermination du rôle de eIF5a et son hypusination

eIF5a est une protéine décrite comme un facteur de traduction important pour de nombreux mécanismes, y compris l'autophagie. Cette protéine subit une modification post traductionnelle peu commune appelée hypusination. Cette marque est réalisée par une déoxyhypusine synthase (DHPS) à l'aide de spermidine. La protéine eIF5a-hypusinilée serait en charge de la traduction de différents régulateurs de l'autophagie tels que TFEB, un gène clé dans la synthèse de l'autophagosome et du lysosome.^{160,161} En effet, il a déjà été montré qu'une inhibition de l'enzyme DHS entraîne une diminution des niveaux d'hypusination d'eIF5a mais surtout une diminution de LC3-II, composant majeur de la formation de l'autophagosome. Nous avons donc, dans un premier temps, étudié l'effet de cette marque post-traductionnelle, l'hypusination, sur la survie parasitaire.

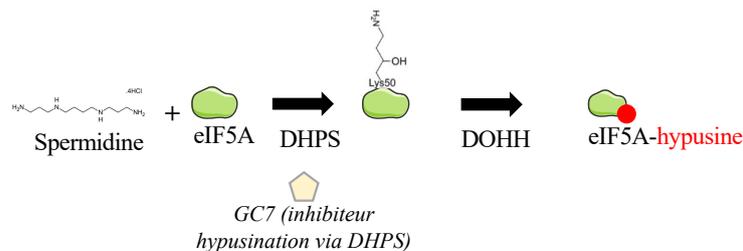


Fig. 37 : Réaction d'hypusination entre une Spermidine et eIF5A grâce à deux enzymes : la déoxyhypusine synthase et la déoxyhypusine hydroxylase, ajoutant une PTM hypusine sur la protéine eIF5A. GC7 est l'inhibiteur de DHPS empêchant la formation de eIF5A hypusinilé.

III- 5) b. L'inhibition de l'hypusination au sein des cellules infectées par *T.annulata*

Nous avons voulu caractériser le rôle de la marque hypusine sur eIF5a au sein de l'infection parasitaire. L'activateur de cette voie : la Spermidine et l'inhibiteur connu de la DHPS : GC7, ont été utilisés comme contrôles. Nous avons traité les cellules infectées TBL3, 24H avec ces différents composés pour comparer leurs effets à ceux de MC2646 et de la Buparvaquone. Nous avons également combiné les traitements MC2646 et GC7 afin de voir si GC7 pouvait inverser l'effet de MC2646. Le comptage parasitaire de cette expérience montre une réduction significative du nombre de parasites après traitement par la buparvaquone ou le composé MC2646, mais pas de réels effets de la Spermidine ou de GC7 sur la survie parasitaire. Cependant, la condition MC2646 + GC7 montre un phénotype intermédiaire, laissant penser que GC7 diminue l'impact de MC2646 sur la survie du parasite.

En parallèle, nous avons réalisé des expériences de Western Blot de eIF5A, qui n'ont montré aucun changement des niveaux totaux de protéine eIF5A, même après les différents traitements. Cependant, le western blot de eIF5A-hypusine a révélé que l'inhibiteur de DHPS, GC7, réduisait le niveau d'hypusination de eIF5A, comme attendu. Les traitements avec MC2646, Buparvaquone, Spermidine n'ont pas eu d'impact significatif sur l'hypusination de eIF5A. En revanche, la combinaison de MC2646 et GC7 a partiellement « sauvé » l'inhibition de l'hypusination lié à GC7 : eIF5A hypusiné augmente quand MC2646 est associé à GC7.

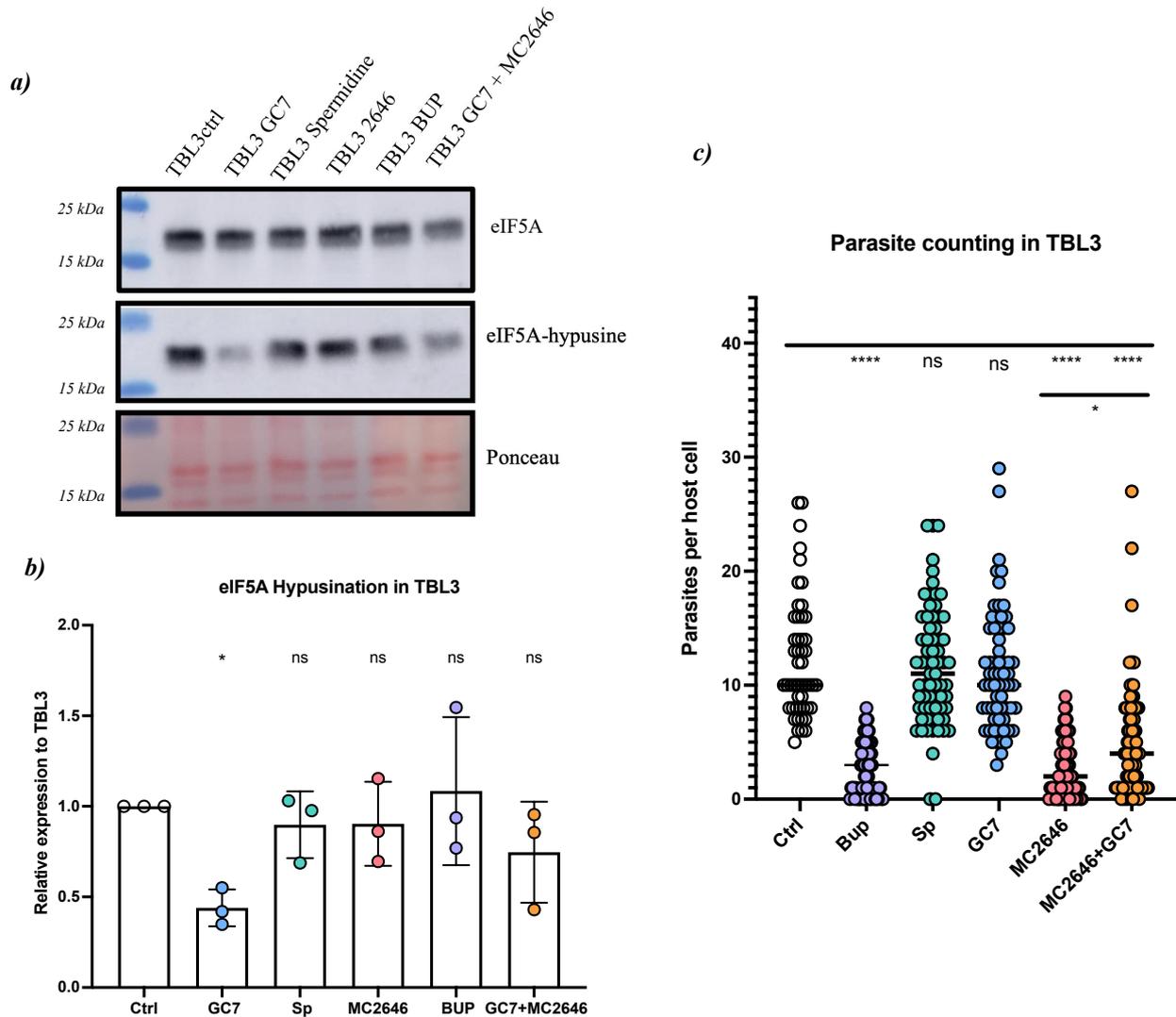


Fig. 38 : L'hypusination de eIF5A dans les cellules infectées.

a) Western blot de eIF5A et eIF5A-hypusine avec coloration au ponceau en-dessous (représentatif de 3 expériences indépendantes)

b) Quantification associée de eIF5A-hypusine. Cette expérience a été réalisée en triplicat et le test de comparaisons multiples de Dunnett a été utilisé pour comparer avec le groupe témoin TBL3 (*pValeur < 0,05).

c) Quantification de la survie parasitaire après 24 heures de traitements. Le test de comparaisons multiples de Dunnett a été effectué contre le groupe témoin TBL3 ($n \geq 50$; ****pValeur < 0,0001). Cette expérience a été réalisée en triplicat et le test de comparaisons multiples de Dunnett a été utilisé pour comparer avec le groupe témoin TBL3 (*pValeur < 0,05).

Les effets GC7 et MC2646 sont diamétralement opposés, en effet, GC7 va prévenir la mort parasitaire associée à MC2646, et en parallèle MC2646 va réduire l'inhibition de l'hypusination causée par GC7. L'hypusination de eIF5A joue un rôle dans l'élimination parasitaire mais elle n'est pas suffisante pour expliquer les effets du traitement MC2646 sur la charge parasitaire.

III- 5) c. Séquestration de eIF5a à côté des noyaux parasitaires

Nous avons effectué des expériences d'immunofluorescence d'eIF5A, combinées au click MC4404, sur des cellules TBL3 contrôles ou traitées avec MC2646, afin de voir si eIF5A co-localisait avec MC4404. La protéine hôte eIF5A est comme le signal click, à côté des noyaux parasitaires et probablement séquestrée par le parasite. Cependant, MC4404 et eIF5a ne colocalisent pas. Après traitement MC2646, et contrairement au signal de click qui reste autour des parasites restants, eIF5A est libéré dans le cytoplasme de la cellule hôte. Afin de définir si cette libération est due au traitement MC2646 ou à la mort du parasite, nous avons réalisé la même expérience avec un traitement Buparvaquone : eIF5A reste localisé au niveau des parasites résiduels, laissant penser que sa libération est spécifique de l'action de MC2646. Cette expérience doit être répétée pour validation ; il faudrait également savoir si la protéine eIF5a, séquestrée puis relarguée, est hypusinée ou non. L'anticorps anti-Hypusine a donné un signal très diffus par Immunofluorescence, ne nous permettant pas de répondre à cette question.

Nous suggérons que la séquestration de eIF5A au parasite pourrait bloquer l'autophagie de l'hôte. Ces résultats sur la localisation eIF5A mettent en évidence le mécanisme de séquestration utilisé par le parasite *T. annulata* pour détourner les machineries de l'hôte afin d'éviter les processus de défense de ce dernier. Nous avons également essayé de déterminer qu'elles sont les structures où sont séquestrées eIF5A et la cible de MC2646 (cf Discussion partie 9 et Annexe 3). Il serait aussi intéressant de tester si d'autres protéines importantes pour l'autophagie, voire pour l'immunité de la cellule hôte, sont séquestrées par le parasite et si le traitement MC2646 les libère, permettant de relancer des mécanismes autophagiques. L'autophagie joue un grand rôle dans différents types d'infection mais aussi dans le cancer, notre modèle semble donc idéal pour étudier ce processus au sein de cellules infectées par *T. annulata*.

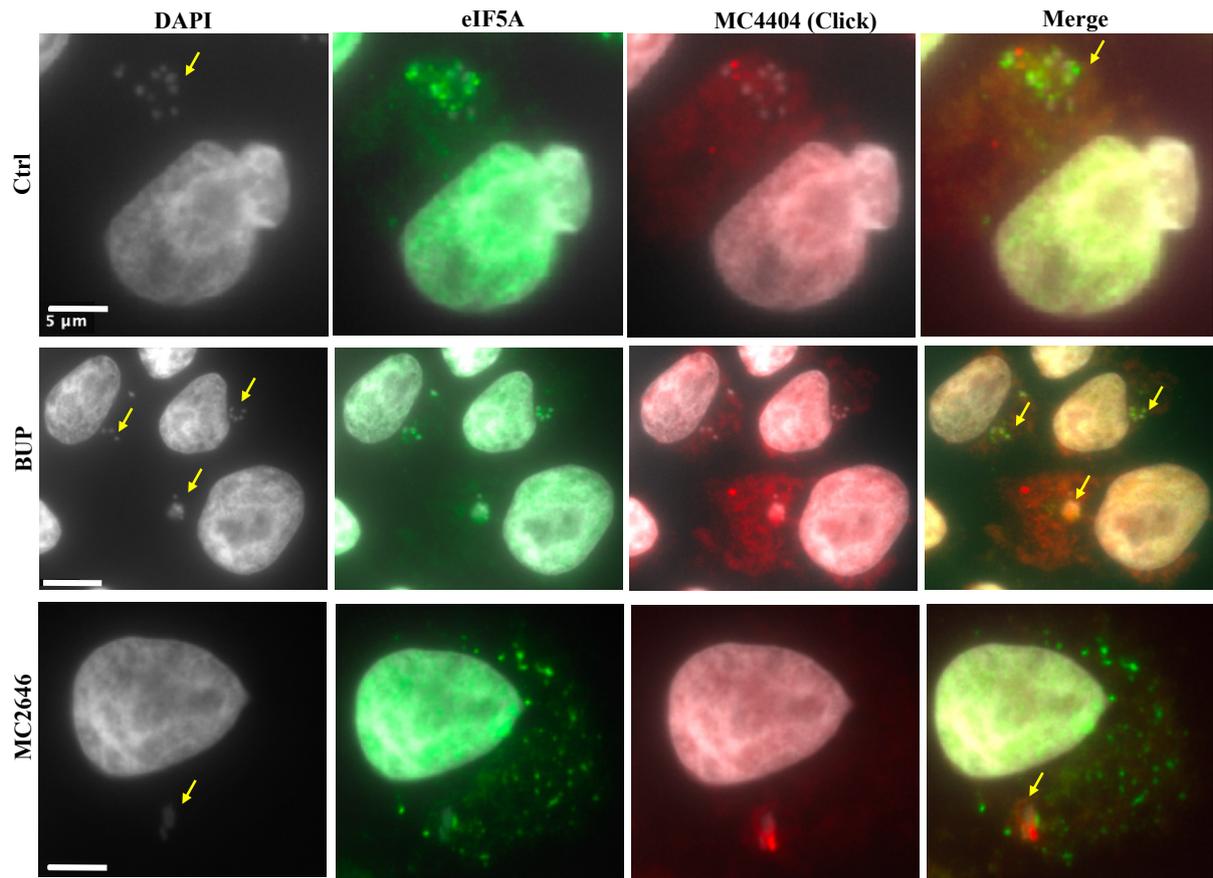


Fig. 39 : Profil de séquestration de eIF5A dans les cellules infectées. La protéine est séquestrée au parasite puis libérée après 24 heures de traitement au MC2646, mais pas suite au traitement à la buparvaquone (Bup). La protéine eIF5A a été suivie par immunofluorescence en vert (Alexa fluor 488). Le MC4404 est marqué en rouge (Azide combiné avec Alexafluor 594). Les flèches jaunes indiquent la localisation du parasite. Scale bar 5 μ m (Ctrl/MC2646) et 10 μ m (Bup)

IV- Rôle central de l'autophagie dans l'infection : une potentielle cible thérapeutique de MC2646

IV- 1) Caractérisation du mode d'action de MC2646

IV- 1) a. Mise en relation du composé MC2646 avec l'autophagie

Dans la partie III de l'introduction, nous avons décrit le rôle de l'autophagie comme un mécanisme cellulaire essentiel participant à l'élimination du pathogène intracellulaire. De façon intéressante, les résultats obtenus dans la partie III des résultats, nous permettent de mettre en relation l'action theilericide du composé MC2646 avec la voie autophagique de la cellule hôte. En effet, nous avons observé :

- le marquage « click » de la cible du composé au niveau de vésicules très rondes dans les cellules non infectées (BL3 & Hela), avec un profil proche de structures lysosomales.
- suite au pull-down du composé, des protéines comme eIF5A, le complément C3 qui interagit avec ATG16L1 (cf Annexe 3), ont montré des profils de séquestration parasitaire et jouent tous un rôle dans l'autophagie ;
- parmi les protéines de l'expérience de Spectrométrie de masse qu'il reste à étudier, beaucoup semblent pointer vers des mécanismes autophagiques.

La séquestration par le parasite de certaines protéines hôtes associées aux processus autophagiques peut avoir deux rôles : séquestrer pour empêcher le bon fonctionnement de l'autophagie de l'hôte ou pour utiliser les voies autophagiques au profit du parasite. Nous avons voulu définir si l'autophagie joue un rôle pour maintenir ou éliminer l'infection et déterminer l'impact fonctionnel des acteurs majeurs de l'autophagie de l'hôte lors de l'infection par *T. annulata*.

IV- 1) b. Analyse transcriptomique après traitement MC2646

En parallèle des expériences de protéomique pour définir la cible de MC2646, nous avons réalisé une analyse transcriptomique du génome bovin et parasitaire (Séquençage ARN) sur des cellules non infectées BL3 comparées à des cellules infectées TBL3, traitées ou non avec MC2646. Cette expérience nous permet de caractériser l'effet de MC2646 sur l'expression des gènes bovins ou parasitaires, dans les cellules infectées et non infectées.

Chaque condition a été étudiée mais, nous nous sommes attardés sur celle TBL3vsTBL3-MC2646 pour mieux comprendre le mode d'action du composé MC2646 au sein des cellules infectées en déterminant les gènes impactés par ce traitement. Cette condition a mis en évidence 13417 gènes, triés sur la p-value ajustée inférieure à 0.001, ce qui a permis de réduire le nombre de gènes identifiés à 3051 gènes, comme étant très différentiellement exprimés suite au traitement comparé au TBL3 Contrôles. Des études de « Gene Ontology » ont été réalisées sur ce groupe de gènes : tout d'abord en séparant les gènes « down-régulés » et « up-régulés », mais aussi en réalisant des sous-groupes à partir des p-value afin d'obtenir des familles d'ontologie plus précises. L'étude de « Gene Ontology » (GO) sur d'importants groupes de gènes n'est pas vraiment révélatrice car ces derniers sont classés dans de grandes familles de processus cellulaires qui englobent une trop grande quantité de mécanismes. Par exemple, la GO des gènes up-régulés par le traitement, sont majoritairement associés au système immunitaire, à la défense de l'hôte, et à la réponse au virus.

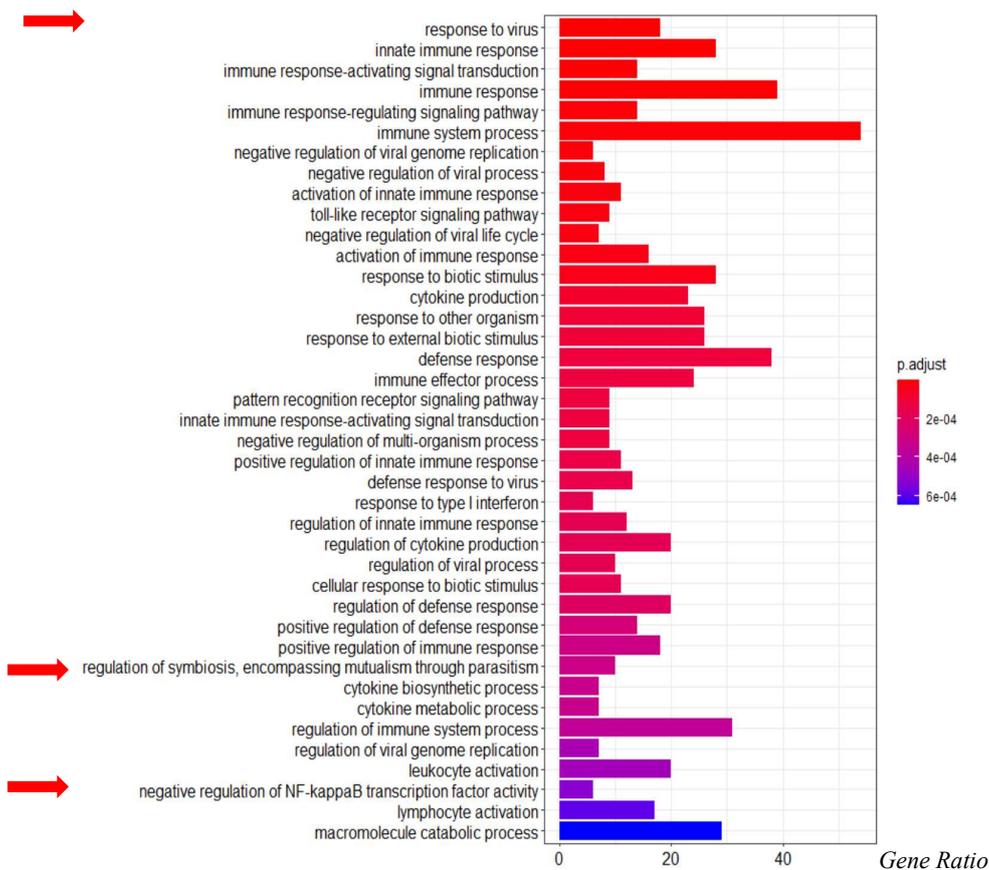


Fig. 40 : Gene Ontology des gènes surexprimés après le traitement MC2646 dans les cellules infectées TBL3, ayant tous une $p_{adj} < 0,001$

Les familles formées de gènes sont en fonction du « gene ratio » = nombre de gènes dans ce groupe et la couleur est en fonction de leur significativité. RNA-seq réalisé sur 3 échantillons biologiques distincts.

En réalité, un grand nombre de gènes qui composent ces familles d'ontologie appartient à des processus autophagiques, classés dans « réponse au virus » : c'est le cas de Beclin1. Cette up-régulation des gènes de défense aux agents pathogènes est donc associée au traitement MC2646. Les sous-groupes nous ont également permis d'obtenir des noms de familles de gènes plus précis notamment « *assemblage et organisation de l'autophagosome* », « *macroautophagy* », « *régulation de Pi3K* » « *transport endosomal* » ... Afin d'être plus stringent, nous avons également réalisé un double croisement BL3vsTBL3 et TBL3vsTBL3-MC2646, afin de détecter les gènes ayant été impactés par l'infection, et sur lesquels MC2646 a un effet opposé. Dans ces 2 listes de gènes différentiellement exprimés, seuls ceux qui ont une p-value ajustée inférieure à 0,001 ont été sélectionnés. Puis, ces deux listes triées ont été croisées pour ne conserver que les gènes qui avaient des expressions opposées entre BL3vsTBL3 et TBL3vsTBL3-MC2646. Cela nous a permis d'obtenir une liste de 1306 gènes afin de déterminer quels sont ceux surexprimés suite à l'infection, dont l'expression diminue après le traitement et inversement. Parmi les gènes surexprimés au cours de l'infection qui deviennent sous exprimés après le traitement, de nombreux gènes sont associés à l'état de transformation des cellules. Inversement, les gènes qui étaient sous-exprimés au cours de l'infection et sur exprimés par le traitement MC2646 sont associés à la réponse immunitaire, à l'autophagie et à l'élimination du pathogène. Une étude plus approfondie de cette liste de gènes candidats avec une cartographie KEGG, doit être réalisée, mais aussi des surexpressions ou des pertes de fonction des meilleurs candidats. Ces résultats de « whole sequencing » semblent soutenir les données obtenues sur le composé MC2646, notamment sur l'état de transformation des cellules, ainsi que l'hypothèse de son effet activateur sur l'autophagie de l'hôte.

* Gènes surexprimés par l'infection et sous exprimés après traitement :	* Gènes sous exprimés par l'infection et surexprimés après traitement :
<ul style="list-style-type: none"> - lysine demethylase 1A : LSD1 - mmp9 (matrix metallopeptidase) - PKM1/2 (pyruvate kinase) - CDK2(cyclin dependent kinase 2) - HK1 (hexokinase 1) - TGFB induced factor - Bcl2 	<ul style="list-style-type: none"> - Beclin1 (initiation autophagy) - Vps37B (interaction LSD1, ESCRT-I protein important for phagophore closure) - Rab interacting lysosomal protein like 2 - unc-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1, initiation autophagy) - biogenesis of lysosomal organelles complex 1 subunit 5 - rubicon autophagy regulator - lysosomal protein transmembrane 5 - lysosomal trafficking regulator

Table 3 : Liste de gènes candidats différentiellement exprimés entre infection et traitement MC2646. Ils sont surexprimés dans l'infection et sous exprimés par le traitement MC2646 et inversement, sous exprimés par l'infection et surexprimés par le traitement MC2646.

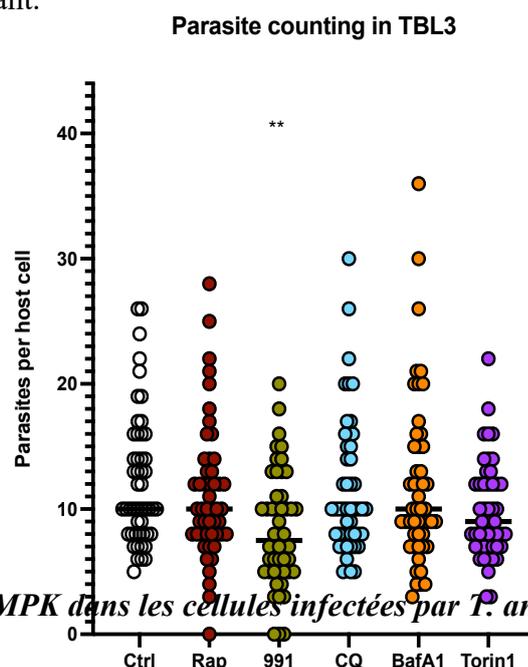
Une expérience de protéomique sur le même modèle est en cours d'analyse. Nous pourrions par la suite croiser les données de protéomique totale et celles du pull down du composé MC2646

avec la liste de candidats de transcriptomique afin d'être plus spécifique. Il faudrait aussi comparer cette analyse de RNA-seq à celle de la Buparvaquone (leur effet sur la survie parasitaire étant similaire) et s'intéresser aux gènes parasitaires impactés par MC2646.

IV- 1) c. L'utilisation de la chimie génétique pour étudier l'effet de MC2646 sur l'autophagie

Étant dans l'impossibilité de faire des modifications génétiques chez le parasite et sa présence rendant les transfections laborieuses, nous avons donc décidé d'utiliser la « chimie génétique » pour caractériser le mode d'action du composé MC2646. Le but est d'utiliser des molécules dont l'effet est connu puis de comparer mais aussi de combiner le composé MC2646 à ces derniers. Nous avons utilisé différents activateurs ou inhibiteurs de l'autophagie pour caractériser si l'un d'entre eux avait un effet similaire à MC2646 sur la survie parasitaire. La Rapamycine et la Torin1 sont des inhibiteurs de mTOR et ils devraient activer l'autophagie. La chloroquine (CQ) et la BafilomycineA1 sont des inhibiteurs du flux autophagique, le premier inhibe l'acidification lysosomale, l'autre empêche la fusion entre autophagosome et lysosome. Enfin, le composé 991 est un activateur de la voie AMPK¹⁶², elle-même activatrice de l'autophagie. Ce dernier entraîne une diminution significative du nombre de parasites par cellules hôtes, mais moindre comparée à l'effet de la Buparvaquone ou de MC2646. L'activation de la voie AMPK induit entre autres l'inhibition du complexe mTOR. Il serait attendu d'obtenir un effet similaire des composés Rapamycine et Torin1, sauf si l'effet observé sur la survie parasitaire est mTOR-indépendant.

Fig. 41 : Test sur la survie parasitaire des activateurs ou inhibiteurs d'autophagie connus. Quantification du nombre de parasites par cellules hôtes après 24H de traitement Rapamycine à 2µM / 991 à 4µM/ Chloroquine (CQ) / BafilomycineA1 (BafA1) / Torin1 à 1µM. Résultats significatifs sous 2-way Anova Dunnett's multiple comparaison test. **p=0,0038



IV- 1) d. Caractérisation de la voie AMPK dans les cellules infectées par T. annulata

Ces résultats nous ont amenés à étudier la voie AMPK au sein des lymphocytes infectés ou non infectés par *T. annulata* afin de déterminer si l'activation de la voie AMPK est responsable de la diminution du nombre de parasites. L'activation de cette voie se fait par la phosphorylation de la Thr172 de AMPK. Nous avons traité des cellules pendant 24H avec le composé 991 et MC2646, à 4 μ M. Ensuite nous avons réalisé des western blot des formes AMPK et AMPK phosphorylé. Nous n'avons observé aucun changement significatif du niveau d'AMPK total dans aucune des conditions. Par contre, nous remarquons une augmentation significative des niveaux de pAMPK dans les cellules TBL3 après traitement 991 et MC2646.

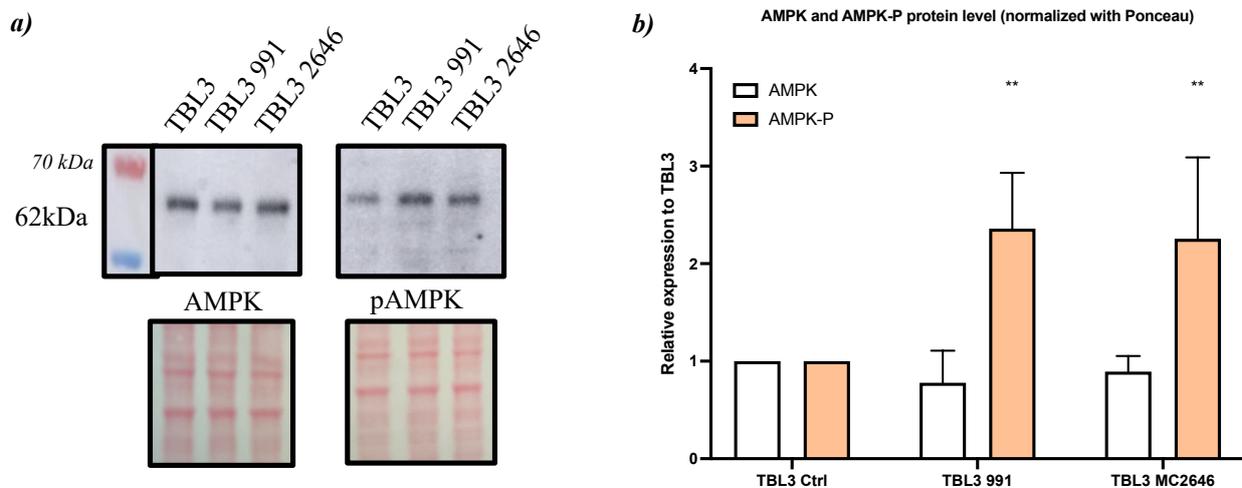


Fig. 42 : Statut de la voie AMPK dans les cellules infectées TBL3.

a) Western blots représentatifs d'AMPK et de pAMPK après 24h de traitement 991 ou MC2646 à 4 μ M.
b) Quantification associée au western blot, de AMPK et pAMPK après normalisation par ponceau. Les tests 2-way Anova de comparaisons multiples de Sidak's ont été effectués contre le contrôle TBL3 (n=3 ; **pValue < 0,01).

Le traitement avec le composé MC2646 active la voie d'autophagie AMPK via la phosphorylation de cette dernière et est corrélé à une diminution de la survie parasitaire. Cependant, la réduction du nombre de parasites observée après traitement 991 reste légère comparée au composé MC2646, ce qui laisse penser que l'activation d'AMPK est nécessaire pour induire l'autophagie mais pas suffisante pour reproduire le phénotype de MC2646 : d'autres voies sont certainement impliquées. Il sera par la suite essentiel de caractériser l'effet du composé MC2646 sur les composants directs de la voie AMPK comme ULK1 ou Beclin1 en déterminant leurs états de phosphorylation par western blot.

IV- 1) e. Détermination de la translocation nucléaire du facteur TFEB

L'activation de AMPK, entraîne l'inhibition de mTOR, qui libère le facteur de transcription TFEB. ¹³⁴ TFEB est séquestré au cytoplasme par mTOR, l'inhibition de ce dernier permet la translocation nucléaire de TFEB qui est un régulateur majeur de la transcription de gènes associés à la biogenèse des lysosomes et l'expression des gènes d'autophagie.

Comme le traitement au MC2646 semble relancer l'autophagie et activer la voie AMPK, nous avons émis l'hypothèse que ce traitement pourrait entraîner une translocation du TFEB du cytoplasme vers le noyau. Nous avons examiné la localisation du TFEB dans les cellules infectées TBL3 ou Tac12 par immunofluorescence et par western blot après extraction des fractions nucléaires et cytoplasmiques. La quantification des expériences d'immunofluorescence a révélé une diminution voire une perte du signal de TFEB dans le cytoplasme de l'hôte après traitement au MC2646, comparée aux cellules infectées Contrôles. Nous n'avons pas pu mesurer une augmentation des niveaux de TFEB dans les noyaux de l'hôte après traitement à cause du niveau basal trop élevé de TFEB dans le noyau et d'un signal très hétérogène entre les cellules. De plus, l'extraction nucléaire et cytoplasmique suivie d'un western blot ne nous a pas permis de quantifier le TFEB cytoplasmique ou nucléaire en raison de difficultés techniques liées au parasite. Le traitement avec le composé MC2646 a induit une relocalisation du TFEB du cytoplasme, probablement vers le noyau dans les cellules TBL3 infectées. Les résultats préliminaires avec le traitement 991 ont montré une translocation nucléaire de TFEB, mais cette expérience doit être répétée pour validation. Nous concluons que l'activation de la voie AMPK (par les composés MC2646 ou 991) et la translocation du TFEB pourraient conduire à l'autophagie et à une réduction de la survie parasitaire.

Il serait également intéressant de tester les autres composés comme la Rapamycine et la Torin1, les inhibiteurs de mTOR, afin de vérifier s'ils engendrent la translocation de TFEB. Le traitement TCP semble lui aussi entraîner une translocation de TFEB, il faudrait donc vérifier si le siLSD1 a le même effet, et si c'est le cas, comprendre ce qui différencie le composé TCP et l'inhibition de LSD1 du traitement MC2646.

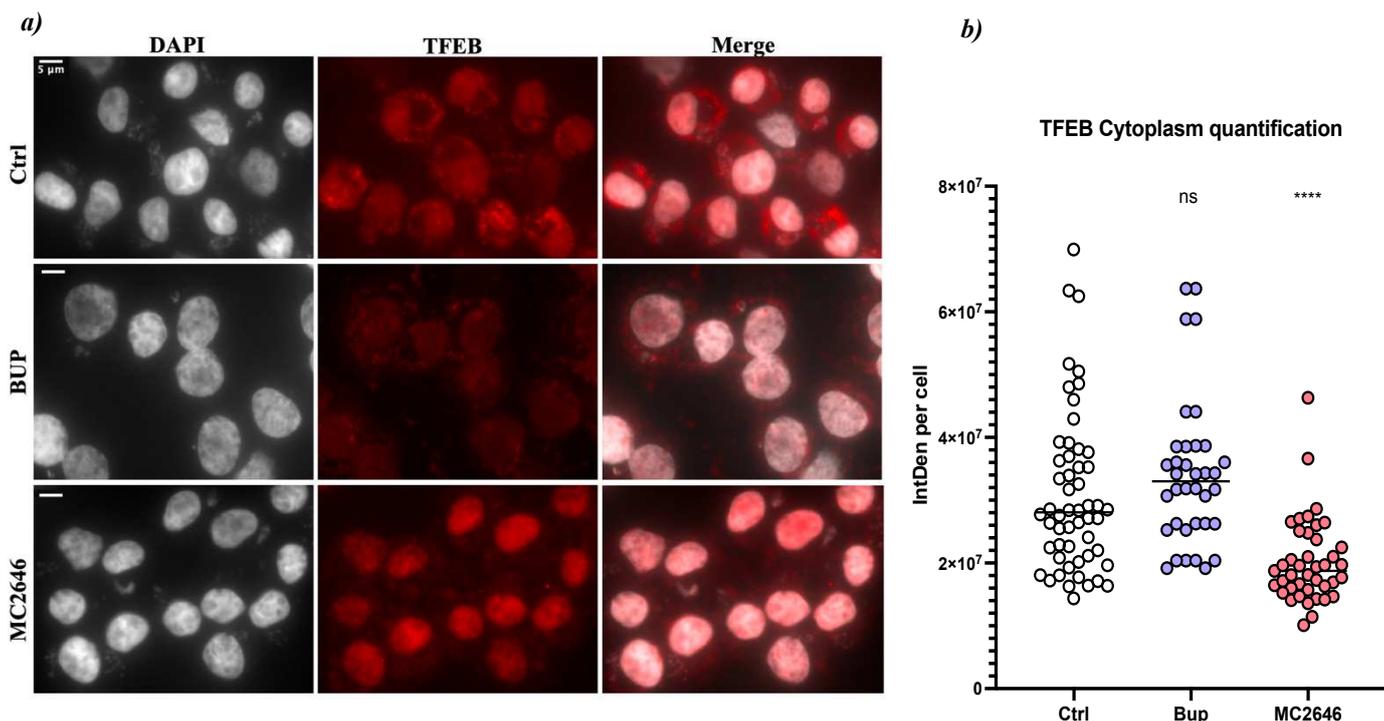


Fig. 43 : Profils de TFEB dans les cellules infectées suite à divers traitements.

a) Images de TBL3 après traitement et immunocoloration de la protéine TFEB. (Microscope à épifluorescence à objectif X63.)

b) Quantification du signal TFEB associée, sur les cellules TBL3 après 24h de traitement. Le signal TFEB diminue dans le cytoplasme après traitement MC2646. Test de comparaisons multiples Dunnett contre Contrôle TBL3 a été effectué. ($n \geq 30$; **** p Valeur $< 0,0001$)

IV- 2) Étude des marqueurs clés de l'autophagie dans les cellules infectées par *T. annulata*

Pour étudier l'autophagie dans notre modèle cellulaire, nous avons fait une analyse comparative sur l'état de localisation des protéines de l'autophagosome (MAP1LC3B(LC3B) et SQSTM1(p62)), du lysosome ou autolysosome (Lysotracker et anticorps anti LAMP1-2) dans des lymphocytes B infectés ou non infectés par *T. annulata* (TBL3 versus BL3 respectivement).

IV- 2) a. Caractérisation du statut lysosomal dans les cellules B bovines infectées et non infectées

Nous avons commencé par tester le profil des lysosomes à l'aide de LysoTracker, un marqueur sélectif des organites acides. Nous l'avons incubé 30 minutes dans des cellules infectées et non infectées, traitées ou non avec MC2646, et combiné avec le composé click MC4404 afin de visualiser la cible du composé. Dans la figure 45, il y a une colocalisation entre le LysoTracker et MC4404 dans les cellules non infectées BL3 et Hela, le nombre de lysosomes augmentant avec le traitement MC2646. Par contre, dans les cellules infectées TBL3, le profil du LysoTracker semble complètement désorganisé, avec un fort signal dans le cytoplasme de la cellule hôte, mais très différent des vésicules observées dans les cellules non infectées. Le profil de click ne colocalise pas avec celui du LysoTracker dans les TBL3, il est, comme montré précédemment, à côté des noyaux parasites, puis forme après traitement MC2646 une enveloppe autour des parasites restants. Aussi, il y a une disparition totale du signal de LysoTracker après traitement MC2646. Notre hypothèse pour expliquer cette grande différence de signal entre BL3 et TBL3, est qu'elle serait due à des fluctuations de pH liées à l'infection puis au traitement MC2646.

a)

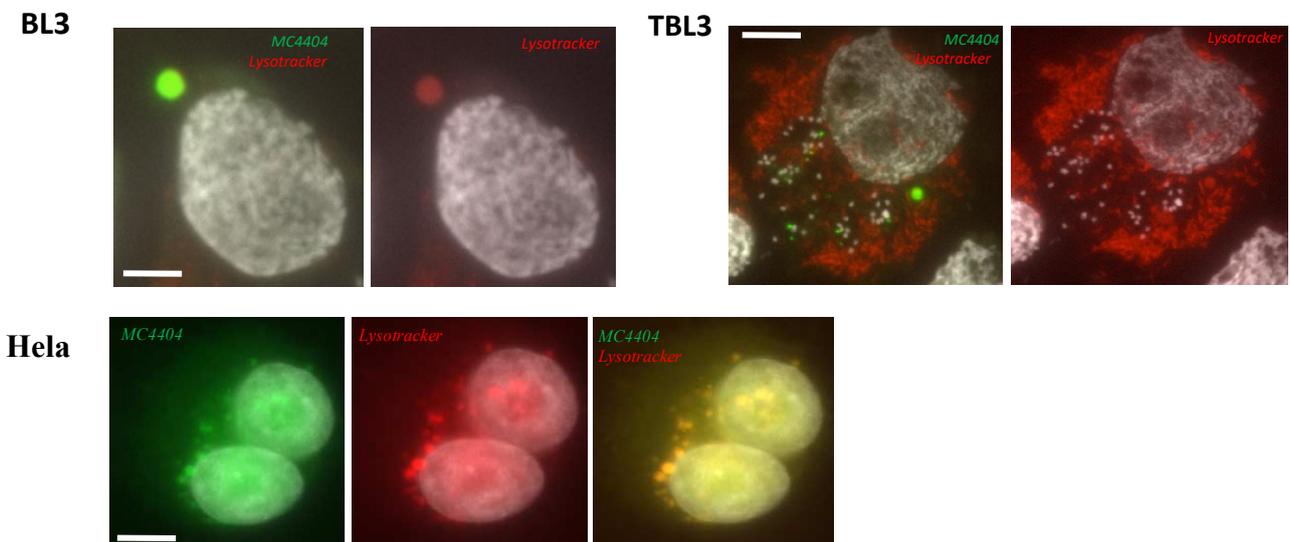
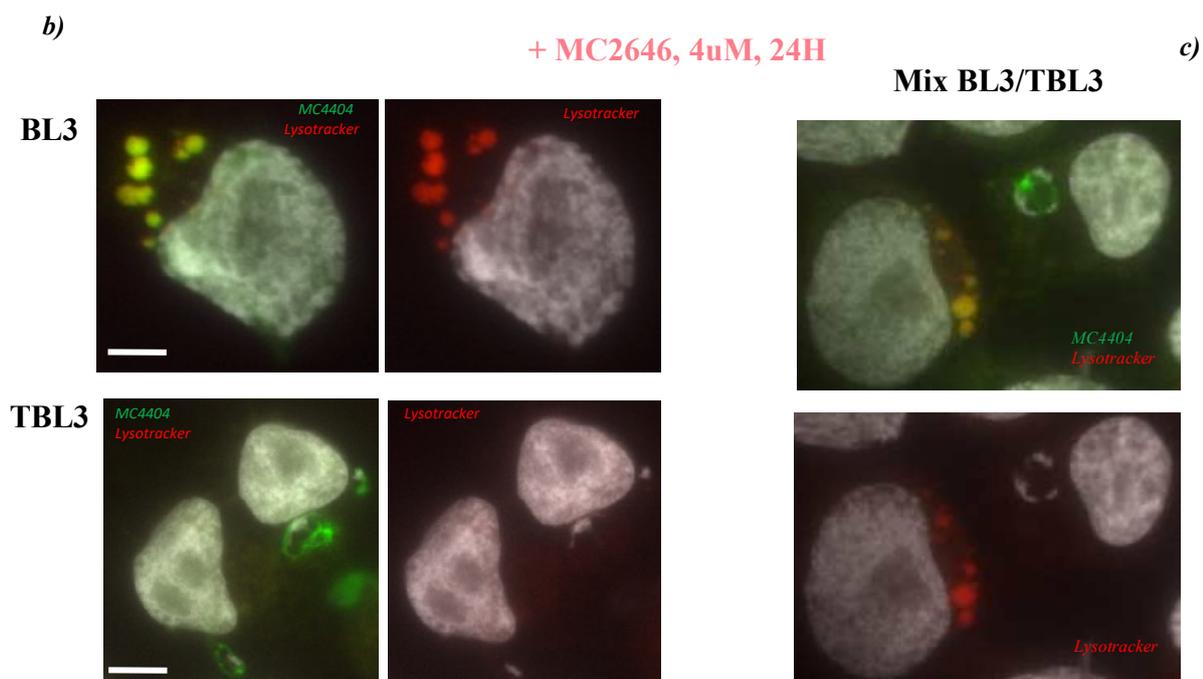


Fig. 44 : Profil lysosomal dans les cellules infectées ou non infectées par *T. annulata*. Les structures lysosomales sont marquées en rouge par le LysoTracker (marqueur de cellules in vivo) ; le signal de click MC4404 est en vert. Scale bar 5 μ m ; 2 μ m pour les BL3. a) Colocalisation des signaux dans les BL3 et Hela mais pas dans les TBL3. b) Après traitement MC2646(4 μ M, 24H) : colocalisation dans les BL3 et disparition du signal de LysoTracker dans les cellules infectées TBL3. c) Expérience confortée par un mélange de BL3 et TBL3 après traitement MC2646 donnant le même profil.



IV- 2) b. Localisation des composants de l'autophagosome : LC3-II et p62, dans les cellules infectées

La même expérience a été faite en combinant une immunofluorescence de p62 et LC3B avec le click MC4404, dans les BL3 et TBL3. Dans les cellules non infectées, BL3, les signaux LC3B et p62 colocalisent dans des vésicules très rondes avec le signal du click MC4404. Avec ou sans traitement MC2646, l'acteur de la formation de l'autophagosome, p62, ne colocalise pas avec le click : il forme des « puncta » dans le cytoplasme de la cellule hôte.

LC3B semble être séquestré à la surface parasitaire sur les cellules TBL3 non traitées. Après traitement MC2646, le signal LC3B rétrécit autour des parasites restants, et pour certaines cellules, ce signal colocalise avec celui du click MC4404. Cela est très étonnant car la protéine MAP1LC3B n'a pas été détectée dans l'expérience de Pull down-Spectrométrie de Masse du composé MC2646. Des expériences d'immunoprécipitation de LC3B après les différents traitements MC2646-MC4564(photocrosslinkable)-Compétition ou immunoprécipitation du composé photocrosslinkable, permettraient de confirmer l'interaction entre la cible du composé et LC3B. Ce signal de LC3B a été obtenu après fixation PFA ; une fixation méthanol nous a permis d'obtenir un signal différent et plus en accord avec le profil que peut avoir un autophagosome, (cf partie IV-4b) mais le profil de fixation PFA n'est pas pour autant à exclure.

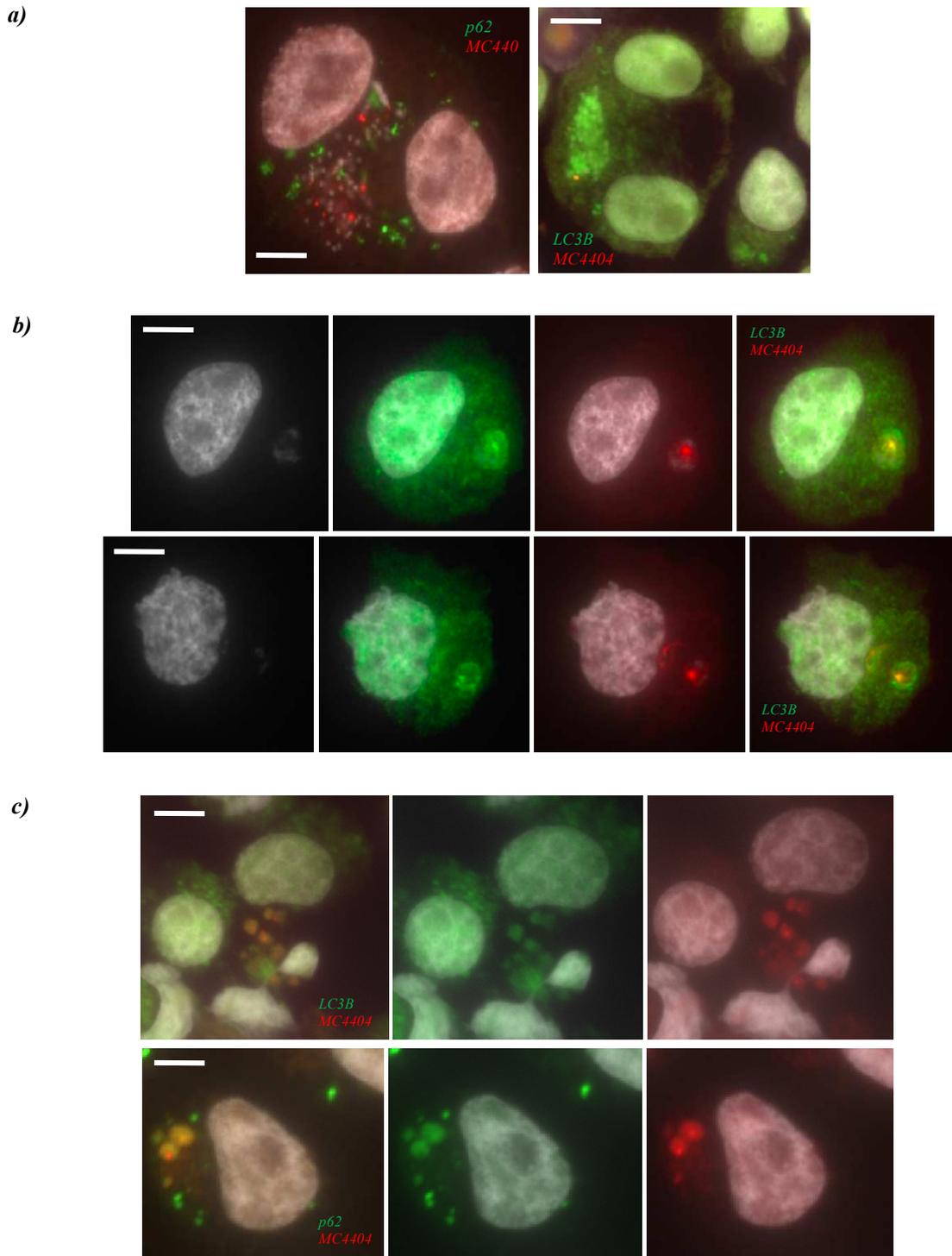
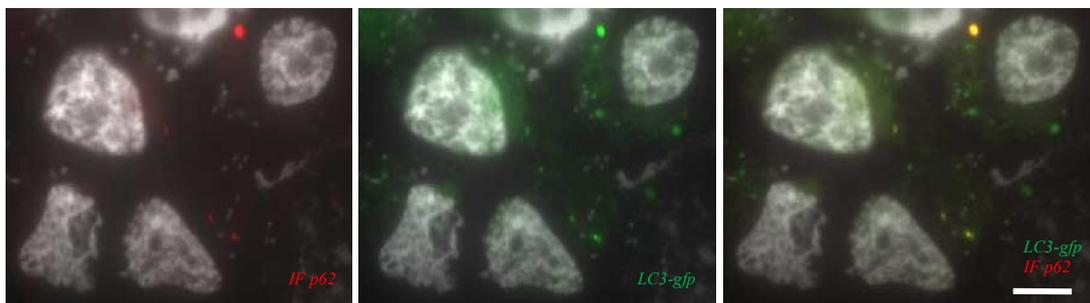


Fig. 45 : Profils des marqueurs de l'autophagosome dans les cellules infectées et non infectées par *T. annulata*.
a) Immunofluorescence de la protéine p62, marquée en vert (Alexa fluor 488), et concentrée en points dans le cytoplasme de la cellule hôte dans les cellules infectées. Scale bar 5 μ m.
b) La protéine LC3B semble être séquestrée au niveau du syncyrium parasitaire et recouvre l'ensemble des noyaux. MC4404 est toujours en points concentrés à côté des noyaux parasites. Profil de LC3B après traitement MC2646(4uM, 24H) : colocalisation avec signal click MC4404 autour des parasites restants mais également au niveau du point plus concentré en forme de bague de MC4404.
c) Les protéines p62 et LC3B (scale bar 10 μ m), marquées en vert (Alexa fluor 488), colocalisent partiellement avec le signal de click (Alexa fluor 594) dans des sortes de vésicules rondes au niveau du cytoplasme des cellules non infectées.

Enfin, nous avons transfecté un plasmide LC3-gfp dans les cellules infectées TBL3, par néo-transfection. Nous avons en parallèle traité ou non ces cellules avec MC2646 et réalisé une immunofluorescence de p62. L'autophagie est « fonctionnelle » lorsque p62 et LC3B colocalisent, signifiant qu'il y a formation de l'autophagosome.

Dans la condition Contrôle, non traitée, la colocalisation est très partielle entre LC3B et p62, alors que dans la condition traitée MC2646, la colocalisation entre p62 et LC3B est totale. Cela nous a amenés à caractériser le statut autophagique dans les cellules infectées puis à déterminer l'effet de MC2646 sur ce dernier.

TBL3 - Ctrl



TBL3 - MC2646

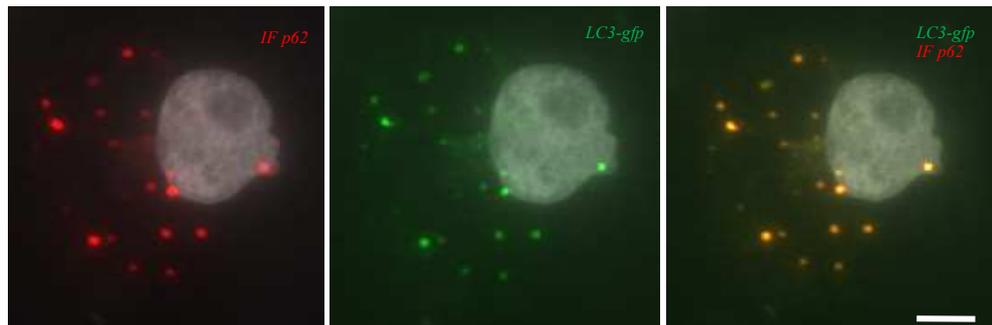


Fig. 46 : Action du composé MC2646 sur LC3B exogène. La protéine p62, marquée en rouge est concentrée en points au niveau du cytoplasme, il en est de même pour le LC3-gfp qui a été transfecté ; mais ils ne colocalisent que partiellement dans la condition contrôle. Après traitement MC2646(4uM, 24H), il y a une colocalisation parfaite entre LC3-gfp et p62, laissant sous-entendre une formation d'autophagosomes et potentiellement l'activation de l'autophagie. Scale bar 10µm (condition Ctrl) et 5µm (condition MC2646).

IV- 3) Caractérisation du statut autophagie au sein des cellules infectées

Au cours de l'infection, des protéines peuvent être séquestrées par l'agent pathogène pour 2 raisons : cela peut bénéficier à ce dernier, car il se sert des mécanismes cellulaires associés à ces protéines ; ou il séquestre des protéines clés de processus cellulaires pouvant lui causer du tort, dans le but de les inhiber. *T. annulata* séquestre au niveau de son syncitium un grand nombre de protéines hôtes : certaines pour se protéger de la réponse immunitaire qui amènerait à son élimination, d'autres pour permettre sa dissémination et bonne répartition dans les cellules en division. L'autophagie est un processus bien connu pour éliminer les agents pathogènes intracellulaires. *Theileria* n'ayant pas une réelle membrane, il est entièrement exposé dans le cytoplasme de la cellule hôte. Il devrait logiquement être repéré et éliminé par le système immunitaire ou bien phagocyté par les mécanismes autophagiques afin de fournir de l'énergie à la cellule hôte. L'hypothèse est qu'il empêche ces grands processus cellulaires de le reconnaître ou de fonctionner en séquestrant des protéines essentielles à leurs bons déroulements. Nous allons donc d'abord déterminer si l'autophagie est bel et bien inhibée dans les cellules infectées TBL3 comparées à des cellules non infectées BL3. La protéine LC3B existe sous deux formes LC3-I et LC3-II. LC3-II est le seul marqueur des autophagosomes, car p62 interagit avec LC3B via le résidu F52, présent à la fois sur la forme LC3-I et LC3-II. ¹⁶³

IV- 3) a. Comparaison de l'ultrastructure des cellules infectées et non infectées

Nous avons tout d'abord mis en place des expériences « d'électron-microscopie » sur des BL3 et TBL3 pour définir leurs différents composants cellulaires. Il est compliqué d'établir un comptage d'autophagosomes ou d'autolysosomes à partir des images recueillies qui sont seulement une coupe de la cellule : en effet, certains composants peuvent se retrouver sur d'autres plans. Cependant, il y a divers autophagosomes ou autolysosomes dans les cellules non infectées BL3, ce qui n'est pas du tout le cas dans les cellules infectées TBL3. Nous supposons que ce sont des autophagosomes-lysosomes, ces structures étant décrites dans la littérature comme ayant de multiples membranes et des composants cellulaires à l'intérieur capturés et potentiellement en dégradation.^{106,164} Ce résultat conforte l'hypothèse d'une absence d'autophagie dans les cellules infectées comparées aux cellules non infectées.

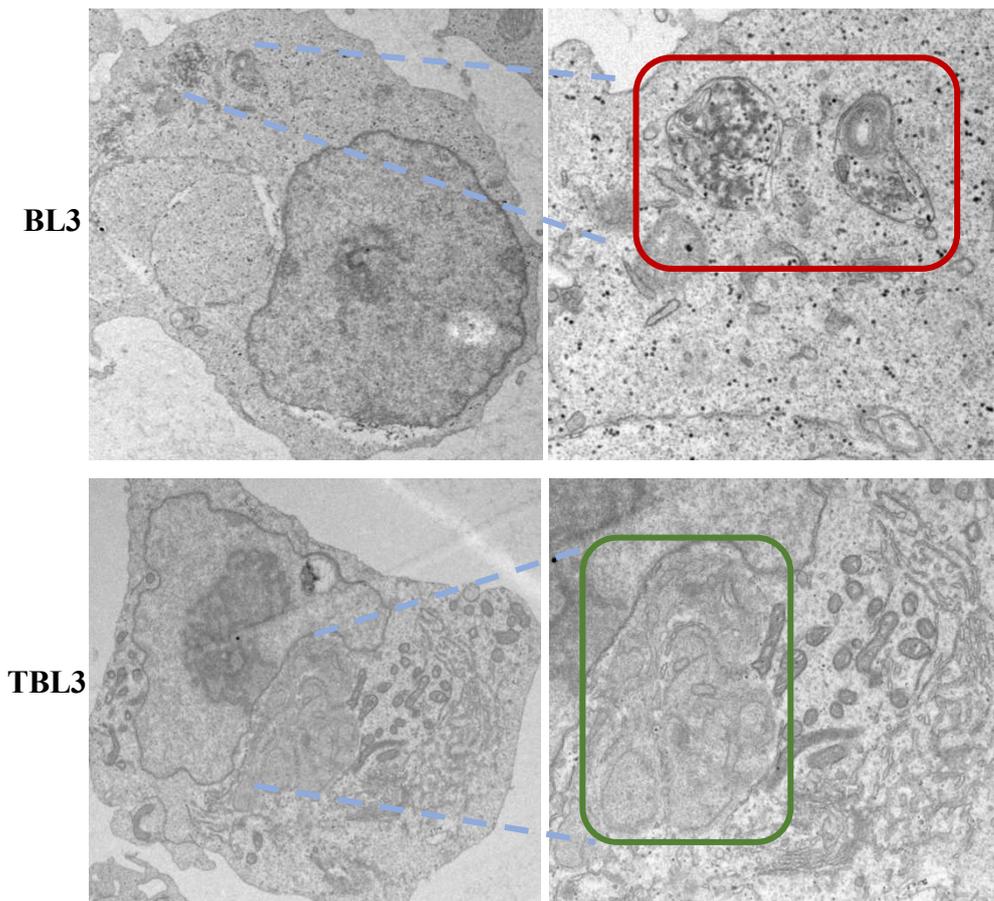


Fig. 47 : Différences dans l'ultrastructure de cellules infectées et non infectées par *T. annulata*. Images obtenues par Electron-microscopie sur des cellules BL3 et TBL3. Le zoom à gauche est de 2900X alors qu'à droite il est de 9300X. Cela nous permet de voir précisément les structures autophagosoma-lysosomales, entourées en rouge, dans les cellules non infectées. Ainsi que le parasite, entouré en vert dans les cellules infectées TBL3.

IV- 3) b. Le profil de LC3-II dans les cellules infectées et non infectées

Nous nous sommes intéressés au statut de LC3-I vs LC3-II au sein des cellules infectées comparées aux cellules non infectées, après traitement MC2646. Nous avons d'abord considéré l'état de LC3B à un temps T. Dans le western blot Figure 49, nous avons pu observer les formes LC3-I et LC3-II dans les cellules non infectées alors que seule la bande représentant la forme LC3-I est présente dans les cellules infectées. Après l'ajout de MC2646, la quantité de LC3-II augmente en intensité dans les cellules non infectées BL3 et elle apparaît dans les cellules infectées TBL3. Il semblerait donc qu'il n'y ait plus d'autophagie dans les cellules infectées par *T. annulata* et que le traitement MC2646 permet une réactivation de ce processus cellulaire.

Mais l'autophagie n'est pas un mécanisme fixe, il évolue très rapidement. Pour étudier et caractériser le statut de l'autophagie au sein d'une cellule mais surtout déterminer si une molécule est activatrice ou inhibitrice d'autophagie, il faut bloquer le flux autophagique puis observer le profil de LC3B en Western blot et par Immunofluorescence.

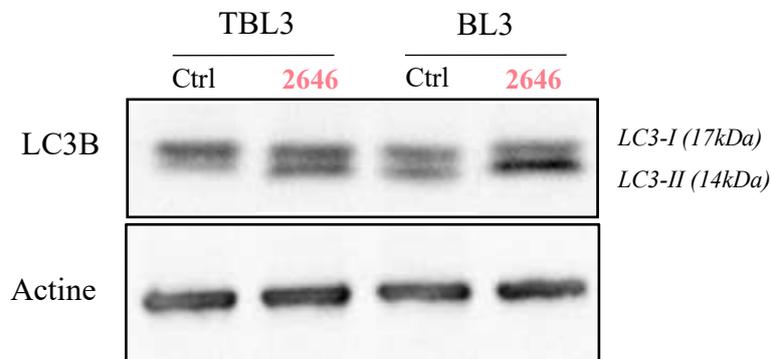


Fig. 48 : Profils de LC3B dans les cellules infectées et non infectées, avec ou sans traitement MC2646. Western blot de la protéine LC3B sous ses 2 formes LC3-I et LC3-II, dans les cellules infectées TBL3 et non infectées BL3. Les TBL3 n'ont pas la forme LC3-II, laissant penser qu'il n'y a pas d'autophagosomes formés et donc d'autophagie. L'ajout du traitement MC2646(4 μ M, 24H) fait apparaître la forme LC3-II dans les TBL3 et intensifie le signal de cette dernière dans les BL3.

IV- 4) Le composé MC2646 : un inducteur d'autophagie dans les cellules infectées par *T. annulata*

IV- 4) a. L'impact du composé MC2646 sur l'ultrastructure des cellules infectées

La même expérience d'électron-microscopie qu'à la Figure.48 a été mise en place sur des TBL3 contrôles et traitées avec le composé MC2646, afin de déterminer l'effet du traitement sur les cellules infectées. Nous remarquons très clairement dans les cellules TBL3 traitées avec MC2646, une apparition de structures similaires à celles observées dans les cellules non infectées BL3, pouvant s'apparier à des autophagosomes ou autolysosomes. Ces structures sont bien distinctes et nombreuses après traitement MC2646. Il est par contre difficile de déterminer les composants à l'intérieur de ces vésicules, notamment s'il s'agit du parasite. Comme attendu, la structure du parasite est moins souvent observée (bien que pouvant être sur un autre plan) alors qu'elle est constamment présente dans les cellules TBL3 Contrôle.

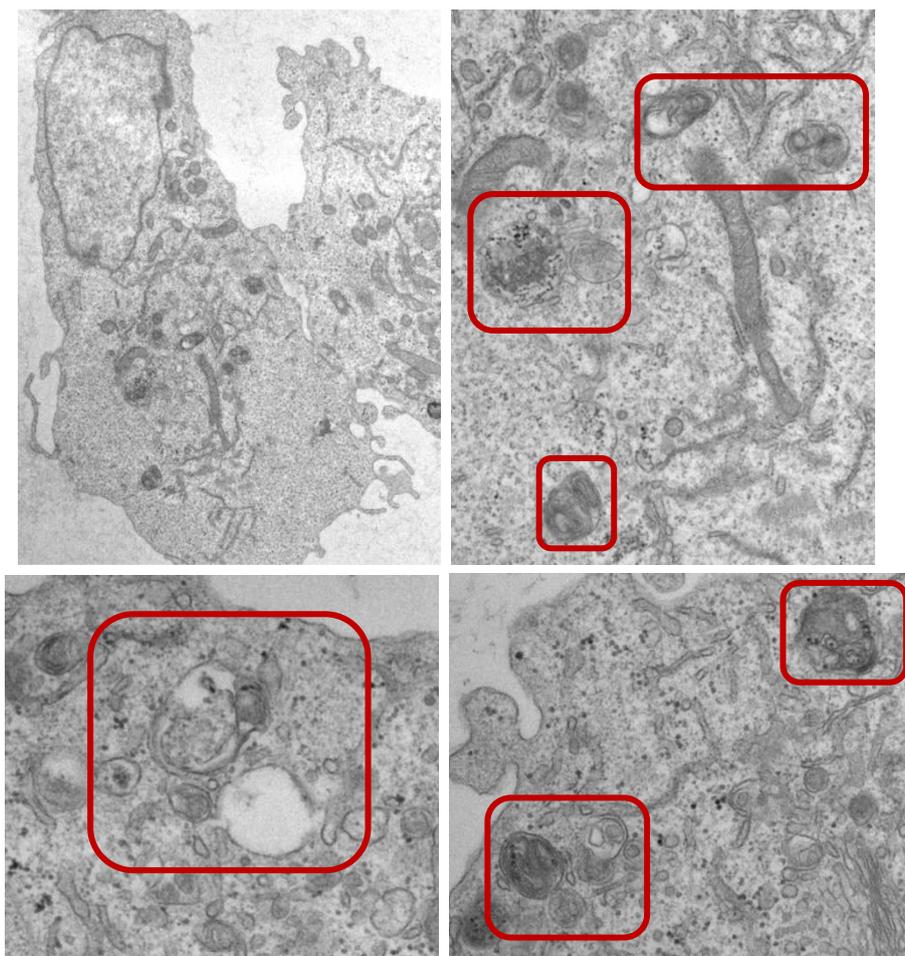


Fig. 49 : Ultrastructure de cellules infectées et traitées par le composé MC2646. Images obtenues par Electron-microscopie sur des cellules TBL3 traitées 24H avec MC2646 à 4 μ M. A gauche, le zoom est de 2900X alors qu'à droite et en bas il est de 9300X. Cela nous permet de voir précisément les structures autophagosomales-lysosomales, entourées en rouge qui sont très nombreuses et à différentes étapes de maturation.

IV- 4) b. Caractérisation de l'effet de MC2646 sur le flux autophagique au sein des cellules infectées

Nous avons voulu définir le statut du flux autophagique au sein des cellules infectées et l'effet du traitement MC2646 sur ce dernier. Le marqueur du flux autophagique est la forme LC3-II de la protéine MAP1LC3B, qu'il est possible de quantifier en Western blot et en IF.

En immunofluorescence, le profil LC3B après une fixation méthanol est très différent que celui après fixation PFA : le signal est en petits points dans le cytoplasme de la cellule hôte, appelés LC3-puncta, qui correspondent aux autophagosomes.

Nous pouvons également souligner l'absence quasi-totale de LC3B dans les cellules TBL3 contrôles, alors qu'il y en a de façon importante, autant que dans des cellules BL3 non infectées (résultats non présentés), après traitement MC2646. Plusieurs expériences ont été réalisées permettant certaines prises d'images au microscope confocal soulignant nettement l'effet de MC2646 dans les cellules infectées.

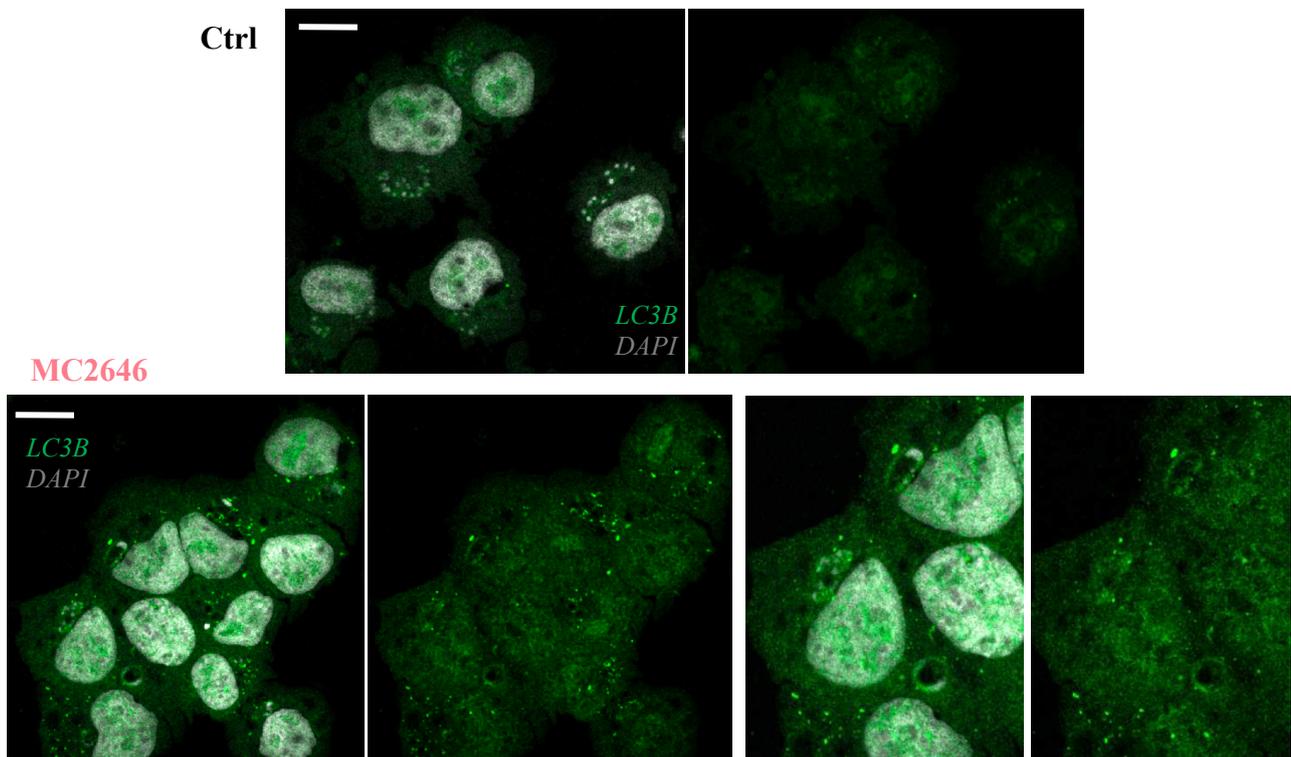


Fig. 50 : Profil de LC3B dans les cellules infectées puis traitées MC2646.

Images prises au microscope confocal 63X, immunofluorescence de LC3B(vert) sur des cellules TBL3 Contrôles ou traitées MC2646(4 μ M, 24H). Absence de signal LC3 dans la condition Ctrl, nombreux LC3-puncta après traitement MC2646. Zoom en bas à droite, montre également un signal qui englobe certains parasites restants. Scale bar 10 μ m.

Sur ces images de LC3B après traitement MC2646, en plus d'un grand nombre de LC3-puncta, il y a des formes bien plus rondes, qui semblent entourer ce qu'il reste de parasites dans certaines cellules. Cela nous permet de penser qu'il y a une élimination du parasite dans les autolysosomes. Ce signal est très proche de celui du « click MC4404 », nous avons donc tenté de combiner la fixation PFA pour le « click MC4404 » et la fixation méthanol pour LC3B, mais cela ne nous a pas permis d'observer le signal de « click », comme avec une simple fixation PFA. Ajuster ce protocole et trouver un marqueur efficace d'autolysosomes dans nos conditions, comme LAMP1, permettant de voir si le signal LC3B colocalise avec ce dernier et englobe les parasites, sont une priorité.

Afin de déterminer l'effet d'une molécule sur le flux autophagique, il faut bloquer l'autophagie avec un inhibiteur de la fusion autophagosome-lysosome, comme la BafilomycineA1.

Nous avons donc traité des cellules infectées TBL3 avec de la Buparvaquone ou du MC2646, combiné ou non avec BafA1 (50nM, 3H), puis réalisé un Western blot de LC3B et une immunofluorescence de LC3B après une fixation Méthanol.

Si l'accumulation d'autophagosomes est plus importante quand le flux autophagique est bloqué, cela signifie que l'autophagie est réellement induite par le traitement.

Dans notre cas, nous observons la formation de quelques autophagosomes dans les cellules TBL3 non traitées. La Buparvaquone donne un résultat intermédiaire, il y a une légère augmentation du « LC3-puncta » que ce soit avec ou sans BafA1 comparé à la condition témoin ; le phénotype obtenu est bien moins clair qu'après traitement MC2646.

En effet, une très nette augmentation du nombre de LC3-puncta est notable après traitement MC2646, qui croit d'autant plus après l'ajout de BafA1. Cette accumulation d'autophagosomes a été quantifiée dans la figure 33. La même expérience a été faite sur des cellules non infectées BL3, le niveau basal de LC3-puncta est déjà élevé dans la condition Contrôle, ce qui est également le cas après traitement MC2646.

De plus, il serait intéressant de faire une étude dans le temps de l'augmentation de LC3-puncta après traitement MC2646 : des résultats préliminaires d'une immunofluorescence de LC3B après 10H de traitement montrent un nombre d'autophagosomes encore plus important qu'après 24H de traitement. Le traitement de 24H permet également de voir le phénomène d'élimination du parasite mais les processus déclenchés par ce dernier prennent très certainement place plus tôt.

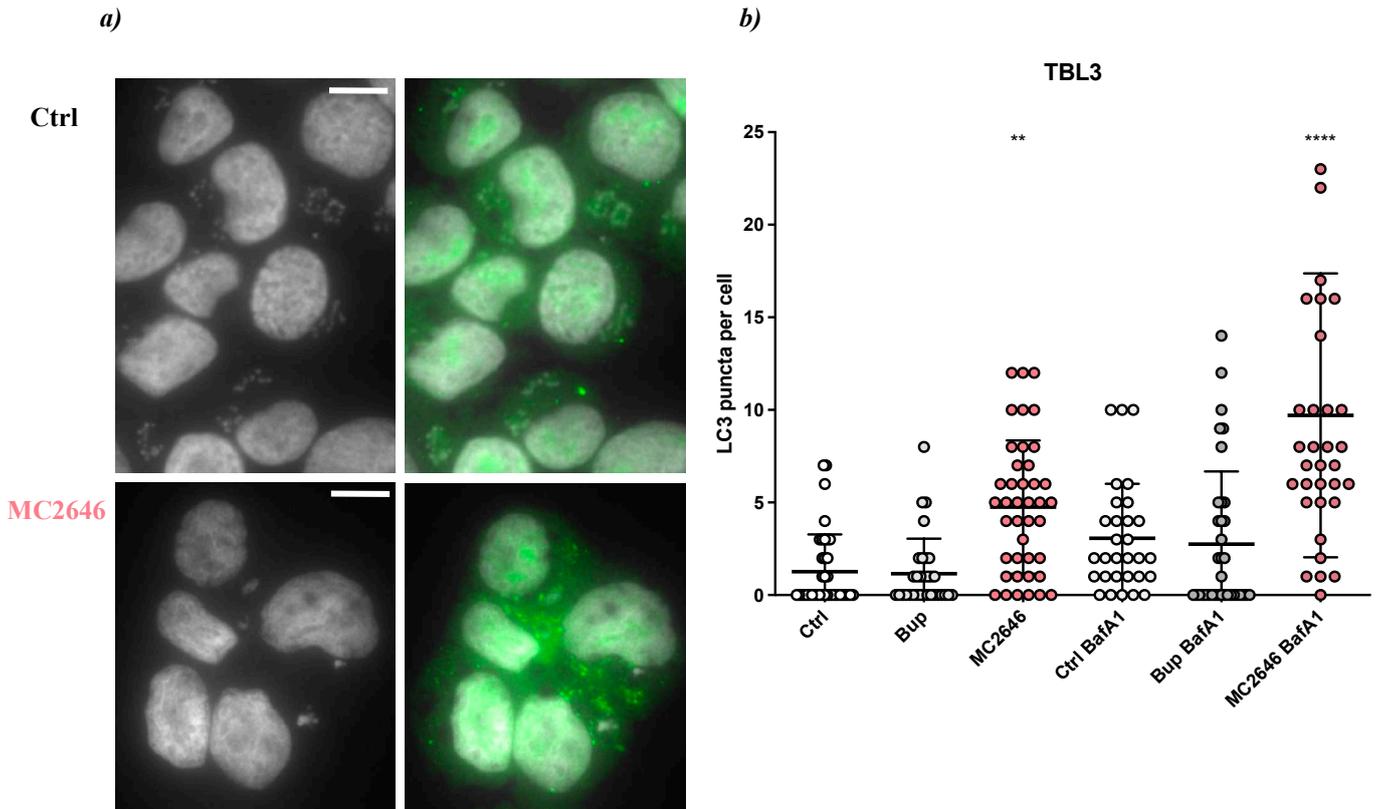


Fig. 51 : Statut du flux autophagique dans les cellules infectées puis traitées MC2646. Scale bar 10 μ m.

a) Immunofluorescence de LC3B(vert) d'une condition Contrôle et MC2646(4 μ M, 24H) couplé à un traitement à la BafilomycineA1(50nM, 3H) montre l'apparition de LC3-puncta dans la condition Ctrl et une augmentation du signal encore plus importante après traitement MC2646.

b) Quantification du signal LC3B, $n > 30$, Statistiquement significatif contre la condition Ctrl avec un test Dunnett's à multiple comparaison, **** $p < 0,0001$, ** $p = 0,011$

Les mêmes échantillons ont été testés en Western blot afin de déterminer sous quelle forme se trouve LC3B, après les différents traitements, en bloquant ou non le flux autophagique (cf Fig.53). Une nette augmentation du signal LC3-II est observée après traitement MC2646 et Buparvaquone. Ce qui différencie MC2646 de la Buparvaquone, c'est qu'en bloquant le flux autophagique avec la BafilomycineA1, nous remarquons une augmentation de LC3-II après traitement MC2646. Cela montre que MC2646 est un activateur de l'autophagie. MC2646 entraîne une accumulation des autophagosomes lorsque leur fusion avec les lysosomes est empêchée par la BafilomycineA1. Cela signifie aussi que l'induction de l'autophagie n'est pas uniquement due à la diminution de la survie parasitaire. La Buparvaquone induit elle aussi l'autophagie, mais il n'y a pas de réelles différences avec ou sans la BafilomycineA1 : le composé Buparvaquone n'est donc pas un inducteur d'autophagie. L'augmentation de LC3-II est probablement due à la disparition parasitaire. Cette expérience aurait besoin d'être répétée, mais ces résultats sont en accord avec les précédentes données sur MC2646.

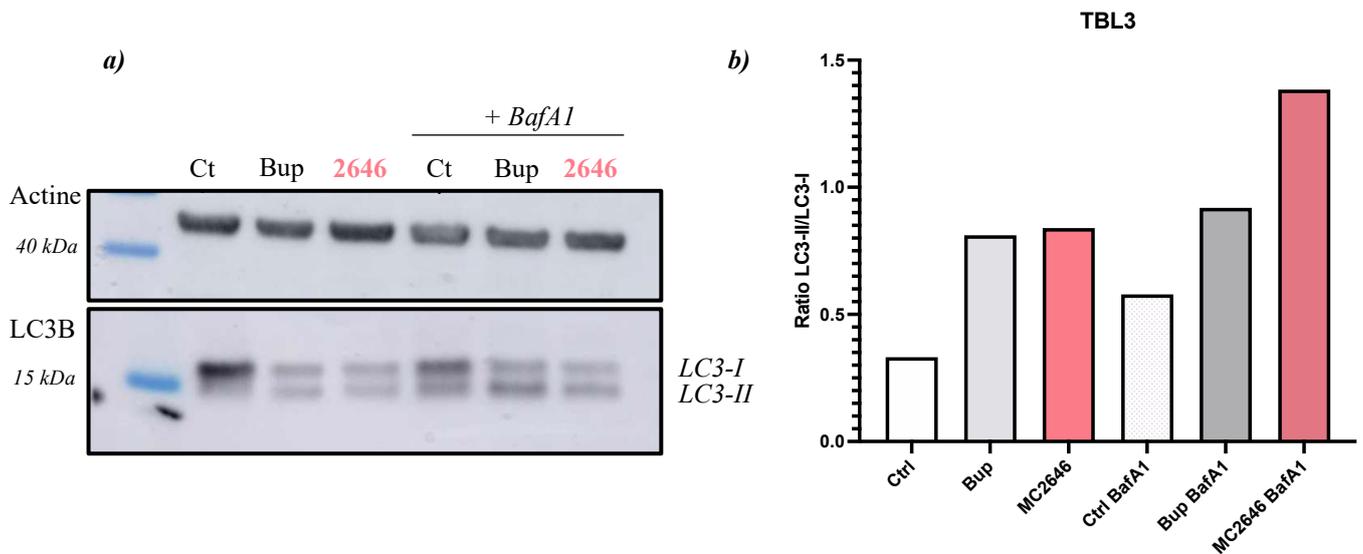


Fig. 52 : Validation au niveau protéique des observations in vivo sur le flux autophagique au sein des cellules infectées et traitées avec MC2646.

a) Western blot de LC3B avec l'Actine comme normalisateur.

b) Ratio des signaux LC3-II/LC3-I montrant une augmentation de LC3-II après traitement MC2646 et d'autant plus quand MC2646 est combiné à BafA1.

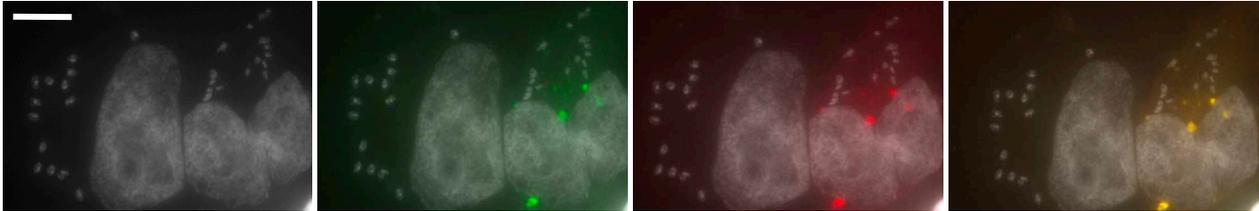
IV- 4) c. Détermination de l'effet de MC2646 sur la fusion autophagosomes-lysosomes

Nous venons de montrer que MC2646 entraîne la formation d'autophagosomes, qu'en est-il de la fusion avec le lysosome ? Des résultats très préliminaires, ont été obtenus grâce à un plasmide de LC3-RFP-GFP transfecté durant 24H et combiné à différents traitements Buparvaquone et MC2646. L'apparition uniquement de corps rouges, s'explique par l'environnement acide du lysosome inhibant la fluorescence de la GFP. La GFP étant éteinte par le pH acide, il ne reste que la fluorescence de la RFP. Ce plasmide permet de mesurer la dégradation lysosomale, suite à la fusion autophagosomes-lysosomes. La présence de corps jaunes indique une expression simultanée de RFP et GFP et donc une altération de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome¹⁶⁵ : le flux autophagique est bloqué. C'est ce que l'on observe pour les cellules TBL3 non traitées et traitées avec de la Buparvaquone pour lesquelles il y a une colocalisation parfaite entre RFP et GFP. Par contre, après traitement MC2646, la diminution des corps jaunes et l'apparition uniquement de corps rouges, signifient que la fusion autophagosome et lysosome a lieu, suivie d'une dégradation lysosomale, et donc que le flux autophagique fonctionne.

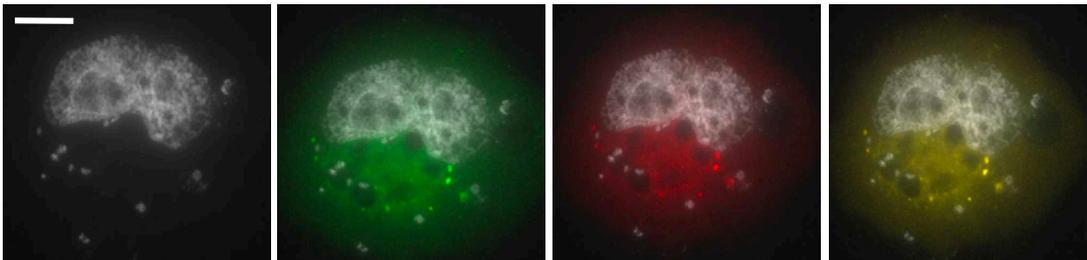
Ces résultats très préliminaires doivent être répétés, puis nous quantifierons les points jaunes vs les points rouges suite aux divers traitements.

Cependant, ils soutiennent déjà l'effet de MC2646 comme activateur de l'autophagie dans les cellules infectées par *T. annulata* où ce processus était inhibé.

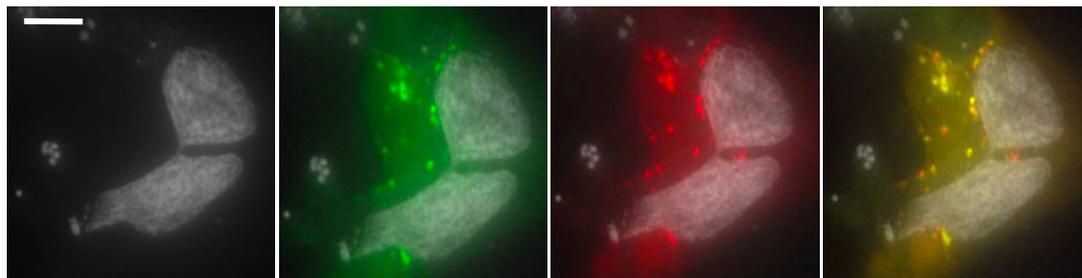
Ctrl



Bup



MC2646



MC2646

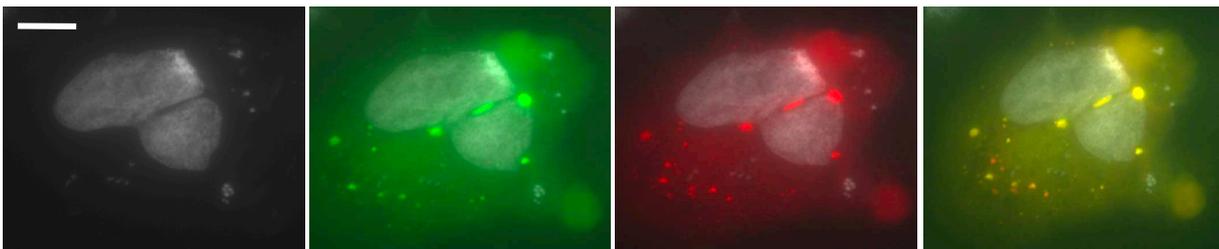


Fig. 53 : Fusion entre autophagosomes et lysosomes après traitement MC2646. Scale bar 5 μ m. Transfection d'un plasmide LC3- RFP-GFP en condition Contrôle, traitée Buparvaquone ou MC2646. Le signal est jaune dans la condition contrôle et Buparvaquone, alors qu'on note un signal avec des points rouges après traitement MC2646 signifiant une fusion entre autophagosomes-lysosomes et donc de l'autophagie.

Résumé : L'ensemble de ces résultats nous a permis d'en apprendre davantage sur les interactions hôte-parasite et de découvrir puis d'étudier le mode d'action d'un nouveau traitement anti-Theilerial. En effet, la technologie innovante de criblage microscopique combinée à une validation par différentes techniques nous ont permis de caractériser un nouvel antiparasitaire prometteur qui impacte la survie parasitaire mais pas celle de l'hôte, ni son cycle cellulaire, ce qui est novateur et remet en question le dogme de la dépendance de l'hôte au pathogène. En revanche, ce composé impacte le cycle de vie du parasite empêchant le passage en mérogonie et semble également diminuer la transformation des cellules hôtes. Défini comme un dérivé d'inhibiteur de LSD1, gène marqueur de certains cancers, il était logique que son effet sur les cellules infectées soit associé à l'inhibition de LSD1. L'effet de MC2646 est similaire à TCP quant à l'augmentation de certaines marques histones comme H3K4me2 ou H3K18me1. Cependant, il semblerait que MC2646 ait également une autre cible. Une perte de fonction de LSD1 diminue légèrement la charge parasitaire, mais cette dernière décroît encore après la combinaison du siLSD1 et de MC2646. Cela montre que la cible responsable du phénotype de MC2646 n'est pas LSD1. L'étape suivante a été de rechercher la cible de MC2646 par « Click Chemistry », associée à de la fluorescence in vivo ou à un pull-down suivie d'une spectrométrie de masse. Nous avons pu déterminer la localisation in vivo de la cible de MC2646 dans différents types cellulaires. Son signal nous a interpellés : dans des vésicules ou séquestré à côtés des noyaux parasitaires. Ce dernier évolue après traitement MC2646 et englobe ce qu'il reste de parasites. Ces profils, combinés aux résultats de protéomique pour trouver la cible du composé et l'absence d'effets néfastes sur la cellule hôte, nous ont amenés à réfléchir sur deux points : les capacités de séquestration de *T. annulata* et le statut autophagique dans les cellules infectées. Nous avons pu confirmer, et découvrir de nouvelles protéines de l'hôte séquestrées au parasite et comparer leurs signaux à celui du composé clické et donc de la cible de MC2646. Nous avons pu définir de nouveaux types de séquestration : celui de la cible de MC2646 ne correspond à aucun signal connu. Certaines protéines séquestrées provenant du pull down du composé, jouent un rôle dans l'autophagie ; leur séquestration pourrait inhiber ce processus et le traitement MC2646 le relancerait en libérant ces protéines. Cela nous a permis de montrer que l'autophagie était bel et bien inhibée dans les cellules infectées, probablement par un grand nombre de mécanismes et que le traitement MC2646 permet à nouveau la formation d'autophagosomes et donc l'activation du flux autophagique. La Buparvaquone élimine également les parasites mais ne déclenche pas le flux autophagique comme MC2646. Cela fait de ce dernier un composé prometteur en parasitologie, dont il faudrait élargir le spectre d'action, notamment en cancérologie.

Discussion

Grâce aux études réalisées dans le laboratoire au cours de ma thèse, nous en avons appris davantage sur l'épigénome parasitaire et sur l'importance de sa régulation au cours du cycle de vie parasitaire.⁷⁹ La caractérisation d'une marque spécifique au parasite *T. annulata*, H3K18me1, nous a également aidés à quantifier la survie parasitaire lors d'un criblage microscopique de petites molécules. Ce criblage fait sur plusieurs librairies, nous a permis de trouver un nouvel anti-theilerial, avec les mêmes propriétés que la Buparvaquone mais une cible protéique différente, afin de pallier aux problèmes de résistance. (Cf Criblage 1, Partie Résultats II-b). Conscients de l'importance des mécanismes épigénétiques au sein de l'interaction hôte-pathogène, nous avons également testé des inhibiteurs d'enzymes épigénétiques afin de déterminer leurs effets sur la cellule infectée et transformée (Cf Criblage 2, Partie Résultats III). L'un d'eux, MC2646, caractérisé comme un inhibiteur d'histone déméthylase est responsable de phénotypes jusqu'à présent inédits : il diminue la survie parasitaire, et le caractère transformant des cellules, sans impacter la survie de l'hôte.

Composés	Cible	Diminue survie parasitaire	Diminue survie de l'hôte	Augmente H3K18me	Diminue Mérogonie
Buparvaquone	TaPin1	Oui	Oui	Non	N.A
Trifloxystrobine	Pas TaPin1 / inconnue	Oui	Oui	Non	Oui
TCP	LSD1	Pas d'effet	Pas d'effet	Oui	Oui
MC2646	LSD1 ?? Inconnue	Oui	Non	Oui	Oui

Table 4 : Tableau récapitulatif des divers composés utilisés et caractérisés au cours de cette étude. Leurs effets sont variables, seul MC2646 impacte la survie et le cycle de vie parasitaire, augmente la méthylation de H3K18me mais ne diminue pas la survie de la cellule hôte.

Aux vues des résultats obtenus lors du Criblage 2 et de la caractérisation du composé candidat, plusieurs points nécessitent une étude plus approfondie.

- 1- L'exploitation de toutes les données du criblage ;
- 2- La caractérisation du comportement du schizonte face à un traitement ;
- 3- L'explication de la mort parasitaire mais pas celle de l'hôte, ce qui est un phénomène inédit ;
- 4- L'impact de MC2646 sur des cellules transformées pour une future étude *in vivo* ;

- 5- Le rôle de LSD1 et de la méthylation pour réduire l'infection ;
- 6- L'effet des traitements sur l'expression génique hôte et parasitaire ;
- 7- La détermination de la cible du composé MC2646 ;
- 8- L'activation de l'autophagie au sein des cellules infectées via MC2646 ;
- 9- La caractérisation des différents profils de séquestration parasitaire ;
- 10- L'utilisation de molécules ciblant l'épigénétique : des traitements de l'avenir.

Les propriétés inédites du composé MC2646 découvert suite au criblage², nous ont amenés à émettre deux hypothèses : la protéine cible de ce composé était une protéine de l'hôte séquestrée par le parasite et le parasite était éliminé via la réactivation des processus autophagiques au sein de la cellule infectée par *T. annulata*.

1- Approfondir les données fournies par les criblages

L'un des buts de ce travail était de trouver un nouvel anti-theilerial pouvant également inverser les changements stables entraînés par l'infection, sans tuer la cellule hôte. Le criblage de nouvelles molécules mis en place au laboratoire nous a permis de tester un grand nombre de composés d'origines très variées. Nous avons pu caractériser la molécule *Trifloxystrobine*, appartenant à la MMV Pathogen box, qui a les mêmes effets que la Buparvaquone, mais une cible protéique différente, qui n'est pas TaPin1. Ce composé pourra être utilisé en complément à la Buparvaquone pour pallier aux problèmes de résistance. Cette technique de criblage ouvre de nouveaux horizons sur la quantité de conditions testées, la robustesse de l'expérience, et enfin l'analyse d'images, donnant accès à un grand nombre de paramètres. Cependant, il reste encore beaucoup de données non exploitées, c'est le cas du profil GFP au niveau syncicium parasitaire. Il serait intéressant d'étudier la forme du schizonte, sa localisation, sa division suite aux traitements, pour mieux caractériser leurs effets directement sur la structure du parasite. Dans le second criblage, certains composés diminuaient la survie de l'hôte et du parasite. Il faudrait tester ces molécules à de plus faibles concentrations afin de confirmer leurs effets et vérifier qu'ils n'impactent pas la survie des cellules non infectées. Si c'est le cas, ils pourraient eux aussi être de potentiels nouveaux traitements contre *T. annulata*.

2- Caractériser le comportement du schizonte après traitement MC2646 : division parasitaire asymétrique

Nous avons pu remarquer, à plusieurs reprises, des cellules sans parasites : à l'observation au microscope sur cellules traitées MC2646 puis fixées, sur les images du criblage, mais également lors d'expériences de « live microscopie ». En effet, le criblage nous a permis d'obtenir les informations sur la survie de l'hôte, du parasite, mais également sur la forme du parasite et le niveau de monométhylation de H3K18. Nous avons noté que la « membrane » du schizonte (marquée par CLASP1-GFP) se recroquevillait sur elle-même après traitement MC2646, dû à la diminution du nombre de parasites. De plus, certaines cellules étaient dépourvues de schizonte mais semblaient continuer à se diviser. Le marqueur GFP nous a également permis d'observer l'effet du traitement MC2646 sur la division cellulaire et parasitaire par « live vidéo microscopie ». *T. annulata* se divise de manière égale entre les deux cellules filles, et nous l'avons vérifié dans la condition Contrôle non traitée.

Cependant, MC2646 induit très clairement une division asymétrique du parasite entre les deux cellules filles : une des deux cellules filles n'a plus de parasite, ou bien moins que l'autre, mais ne meurt pas pour autant.

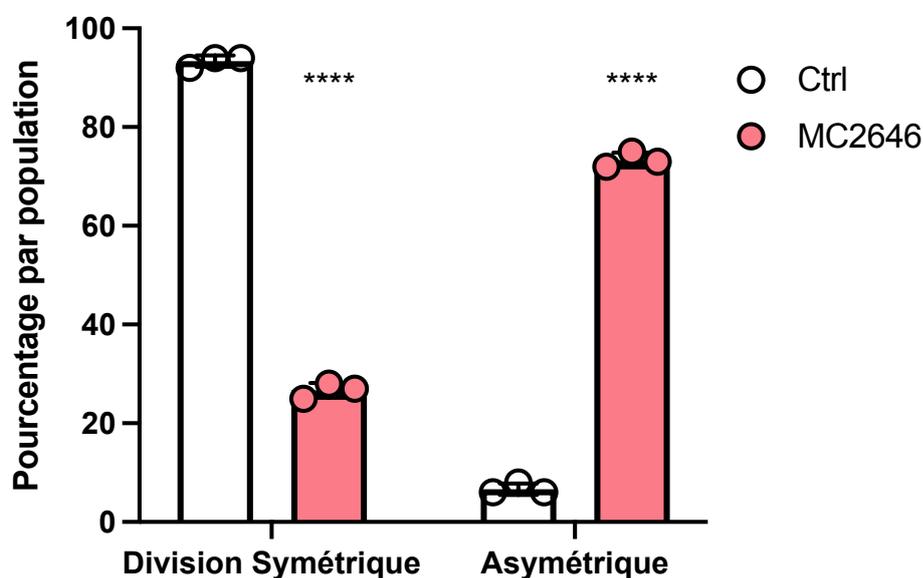


Fig. 54 : Division parasitaire asymétrique après traitement MC2646. Graphique représentant le pourcentage de cellules où la division parasitaire a été symétrique entre les deux cellules filles ou asymétrique. Les cellules étaient non traitées (Ctrl) ou traitées MC2646 durant 24H avant la prise d'images au microscope. L'accumulation d'images durant 12H fournit une vidéo sur laquelle les comptages sont effectués. La majorité des cellules contrôles ont une division symétrique. La balance s'inverse après traitement MC2646 avec une grande partie des parasites qui reste uniquement dans une cellule fille ou se divise de façon inégale. La différence entre ces deux conditions est significative selon un test « 2 way anova Sidak's multiple comparaison test ».

La même expérience a été faite avec la Buparvaquone mais comme cette dernière entraîne la mort assez rapide des cellules infectées il a été difficile de conclure sur le type de division parasitaire. Cette asymétrie est-elle une cause ou une conséquence du traitement MC2646 ? L'élimination totale du parasite est-elle possible grâce à ce phénomène de dilution parasitaire à chaque division ?

Pour répondre à cela, il faudrait réaliser des vidéos des cellules traitées avant 24H de traitement pour déterminer s'il y a une diminution du signal GFP dans une des deux cellules filles à chaque division dès le début du traitement, et ce jusqu'à obtenir des cellules sans parasite. La seconde hypothèse serait que le traitement MC2646 entraîne une diminution de la charge parasitaire telle, que les parasites survivants restent dans une seule cellule et ré-augmentent en nombre avant de se diviser et se disséminer dans d'autres cellules. En effet, dès 24H de traitement, certaines cellules se retrouvent sans parasite et d'autres avec un nombre très réduit. Si ces cellules ne sont pas retraitées, celles qui ont gardé quelques parasites vont permettre à l'infection de reprendre le dessus : le nombre de parasites par cellules hôtes va ré-augmenter, et les cellules non parasitées seront à nouveau inexistantes. Il faut éliminer la totalité des parasites pour éviter une nouvelle contamination des cellules ; mais augmenter la dose du traitement ou traiter les cellules tous les jours finit par impacter la survie de la cellule hôte. Il faudrait ajuster une dose et une durée de traitement optimales ou bien traiter dans un premier temps les cellules avec MC2646 puis combiner ce traitement avec un autre composé comme la Buparvaquone ou la *Trifloxystrobine* à faible dose afin d'éliminer spécifiquement les cellules infectées restantes.

Une étude a montré une division asymétrique des cellules, associant l'accumulation de « midbody » à une faible activité autophagique au sein des cellules souches et cancéreuses ; alors que les cellules normales ou différenciées éliminent les « midbody » et ont une forte activité autophagique.¹⁶⁶ Il en est peut-être de même au sein des cellules infectées par *T. annulata*, : la cellule qui conserve le parasite a une meilleure tumorigénicité et une autophagie plus faible que la cellule sans parasite. Pour réellement définir l'impact de la perte de parasite sur les cellules, il faudrait réaliser une expérience de « single RNA-sequencing » après traitement MC2646 et comparer l'expression génique des cellules.

3- La remise en question du dogme de co-dépendance hôte parasite

Un phénotype plus surprenant a été découvert suite au criblage des molécules caractérisées comme des inhibiteurs d'enzymes épigénétiques. En effet, ce dernier, va à l'encontre de la théorie de co-dépendance entre l'hôte et le parasite⁵³ : il élimine le parasite aussi bien que la Buparvaquone mais ne semble pas impacter la survie ou le cycle cellulaire de l'hôte. Cela remet en question le dogme d'addiction parasitaire ou de co-dépendance. Jusqu'à présent, une cellule dont le parasite mourait, était aussi éliminée, c'est le cas avec le traitement à la Buparvaquone. La Buparvaquone élimine le parasite prioritairement à la cellule hôte, il en résulte une mort cellulaire élevée,⁵³ qui peut être due à la libération de p53, séquestré au parasite, après traitement.⁵ En réduisant le nombre de parasites par cellules hôtes, ce traitement permet la translocation nucléaire de p53 qui peut reprendre son rôle de gardien du génome et déclencher l'expression de gènes pro-apoptotiques.⁵ Il est donc étrange que la diminution de parasites après traitement MC2646 n'entraîne pas la mort de la cellule hôte, car cela devrait également libérer le facteur p53. Malheureusement, nous n'avons pas pu trouver d'anticorps p53 donnant un marquage similaire à l'étude précédemment publiée sur la Buparvaquone⁵ afin de caractériser l'effet du composé MC2646. L'action de la Buparvaquone et du composé MC2646 est diamétralement différente même si le résultat final sur le nombre de parasites par cellules hôtes semble identique. Notre hypothèse est que dans le cas de la Buparvaquone, il y a une perte sévère et brutale du nombre de parasites par cellules hôtes et cela entraîne un dérèglement du fonctionnement hôte-parasite et donc une condition de stress, amenant à la mort de la cellule. Par contre, avec MC2646, l'autophagie est réactivée dans la cellule hôte, c'est un processus physiologique qui participe à l'homéostasie cellulaire, et qui va digérer le parasite, tout en fournissant l'énergie à la cellule pour survivre. Comme le traitement MC2646, n'impacte que la survie parasitaire, nous pouvons supposer que le phénotype transformant de la cellule hôte est conservé. Les résultats préliminaires semblent montrer que le caractère transformant des cellules diminue après traitement MC2646. Ce nouveau traitement a donc de nombreux avantages car il est le premier composé à ne pas éliminer les cellules hôtes.

4- La diminution du phénotype transformant entraînée par MC2646

Des études génétiques de Atg7, Atg5 et Becn1 chez la souris, montrent un rôle de l'autophagie dans la suppression de l'initiation tumorale. Lorsque l'autophagie est altérée, comme elle semble l'être dans les cellules infectées par *T. annulata*, il y a une augmentation de la formation de tumeurs.¹¹⁷

Après traitement MC2646, l'autophagie est activée et le caractère transformant diminue, cependant, la cellule hôte ne semble pas mourir pour autant. Il serait donc primordial de vérifier l'effet *in vivo* de ces composés afin de déterminer si l'état transformant associé à l'infection est irréversible ou non. Pour cela, nous injecterons des cellules tumorales bovines infectées par *T. annulata* (=xénogreffe), traitées ou non avec MC2646 au sein d'embryons de Zebrafish et observerons la croissance tumorale durant 4 jours.⁵³ Il serait aussi intéressant de le comparer à MC2645, qui, malgré un effet similaire sur la survie parasitaire, conservait le phénotype transformant. Cela soulignait la puissance des modifications épigénétiques dans la cellule hôte, mises en place par le parasite qui persistent même après la disparition de ce dernier. Cependant MC2646 semble à la fois éliminer le parasite, le caractère transformant, mais la cellule hôte semble être peu impactée, ce qui est particulièrement surprenant. Nous cherchons donc à savoir si la cellule est revenue à un statut « non transformé », pour cela nous avons les résultats préliminaires du séquençage ARN. Certains oncogènes comme MMP9, PKM1/2, HK1/2, BCL2... nous servent à déterminer l'état cancéreux des cellules : leur expression est augmentée par l'infection et diminue suite au traitement MC2646. Il faut à présent valider ces résultats par des expériences de qPCR. Une expérience avec un marquage BRDU reconnu par un anticorps spécifique ou EDU en utilisant la technologie de « Click Chemistry », confirmerait que les cellules traitées par MC2646, incluant celles où il n'y a plus de parasite sont toujours capables de se diviser. Ce taux de réplication pourrait être comparé à celui de cellules non infectées afin de conclure sur l'état de transformation des cellules infectées après traitement MC2646.

5- Le rôle de LSD1 et de la méthylation pour réduire l'infection

L'étude de H3K18me a démontré l'importance de la méthylation des histones pour la régulation du cycle de vie parasitaire. Moduler les niveaux de méthylation est une nouvelle façon de comprendre le rôle de cette dernière dans l'infection.

Dans le criblage d'inhibiteurs d'enzymes épigénétiques, nous avons relevé les niveaux de méthylation de H3K18me et nous les avons associés à la survie parasitaire. Nous avons remarqué que certains composés qui entraînaient une diminution de la survie parasitaire, augmentaient la marque H3K18me1. Nous pourrions croire que cette augmentation est liée à la mort parasitaire, cependant le composé TCP augmente également H3K18me mais n'impacte pas la survie parasitaire. Inversement, la Buparvaquone tue le parasite mais n'augmente pas les niveaux de méthylation.

De plus, dans la Figure 23 (cf Résultats partie III), d'autres inhibiteurs d'histones déméthylases, eux aussi dérivés de TCP, n'impactent ni la méthylation ni la survie parasitaire donc l'effet sur les niveaux de méthylation et sur le parasite semble spécifique de MC2645 et MC2646. Cet effet est-il lié ou non à LSD1 ? Il est difficile de donner une réponse radicale, en effet, nos collaborateurs Italiens de l'Université de Sapienza à Rome, ont montré que ces composés dérivés de TCP inhibaient LSD1.¹⁵⁵ Ces inhibiteurs n'ont pas d'effet direct sur la protéine LSD1, effectivement TCP interagit avec le domaine FAD empêchant son interaction avec LSD1 et donc la déméthylation.¹⁶⁷ Le marqueur protéique pour vérifier l'inhibition de LSD1 est sa cible histone H3K4me2, qui augmente après un siLSD1, et un traitement TCP ou MC2646. De plus, la perte de fonction de LSD1 entraîne une diminution du nombre de parasites par rapport à une condition contrôle, mais qui n'est pas comparable à celle obtenue après traitement MC2646. Cependant le composé TCP, même à une concentration de 100uM, n'a pas montré d'effet sur la survie parasitaire. Le mode d'action de TCP et MC2646 est donc différent. Le composé MC2646 est peut-être plus efficace que la perte de fonction engendrée dans les cellules, et le LSD1 résiduel pourrait expliquer le phénotype intermédiaire obtenu suite au siLSD1. Enfin, le signal de « Click chemistry » du composé a montré un profil très net à côté des noyaux parasitaires. La protéine LSD1 hôte peut être séquestrée au parasite, cependant le profil en Immunofluorescence de LSD1 est très diffus et ne semble pas particulièrement parasitaire. Nous avons également cherché s'il y avait un homologue de LSD1 chez *T. annulata*, ce dernier a une protéine « amine oxidase flaving containing ». Nous avons supposé que les dérivés de TCP, ciblent à la fois le LSD1 Bovin et l'amine oxidase parasitaire. Si c'était le cas, le signal de la cible du composé devrait plutôt se trouver sur les noyaux parasitaires et non pas à côté.

L'enzyme histone déméthylase LSD1 a un rôle central dans de nombreux cancers. Elle régule également la protéine p53, gardienne du génome, en la déméthylant et l'empêche de jouer son rôle pro-apoptotiques au sein des cellules.⁹⁷ LSD1 est surexprimé dans les cellules infectées par *T.annulata*, ce dernier non seulement séquestre p53 mais bloque aussi très probablement son activité.

L'inhibition chimique (TCP) ou par perte de fonction de LSD1, entraîne l'activation de l'autophagie.¹⁰² Nous devons à présent étudier le flux autophagique après traitement TCP ou inhibition de LSD1 au sein des cellules infectées par *T. annulata*. Il reste à définir l'action supplémentaire de MC2646 qui permet d'impacter la survie parasitaire : a-t-il une cible supplémentaire à LSD1 ? Son efficacité est-elle bien plus importante que le composé parent TCP ou que l'inhibition (partielle) de LSD1 ?

6- L'effet des traitements sur l'expression génique hôte et parasitaire

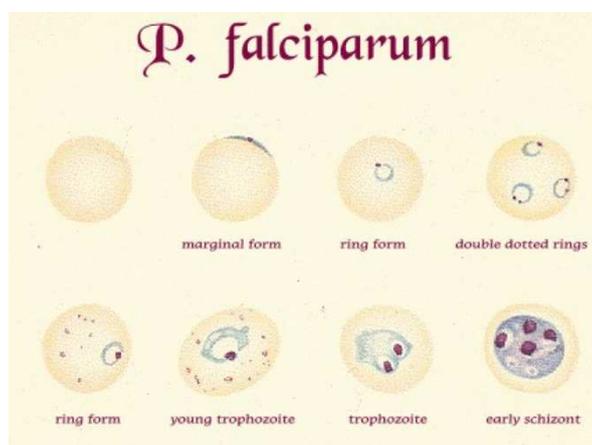
Ces résultats n'excluent pas un rôle de LSD1, peut-être en second plan, dont l'inhibition viendrait appuyer d'autres processus. De même pour l'augmentation des niveaux de méthylation, celle de H3K18me va empêcher le passage au stade mérogonie. Une hyperméthylation de différentes cibles histones est très certainement liée à une expression génique différente entre des cellules traitées ou non. Ces changements de niveaux de méthylation pourraient permettre à la cellule d'inverser les modifications de l'épigénome engendrées par le parasite mais aussi d'éliminer le parasite en réactivant certaines voies de signalisation. C'est d'ailleurs ce que l'on a pu observer à travers l'expérience de séquençage ARN des cellules infectées ou non et traitées/non traitées. Les données de séquençage comparant les cellules infectées (TBL3) des cellules non infectées (BL3) sont en cours d'analyse mais semblent montrer que les mitochondries jouent un rôle central dans l'infection. Nous nous sommes rendus compte d'une augmentation du nombre de mitochondries au cours des expériences d'électron-microscopie, qu'il est difficile à quantifier car nous travaillons sur une coupe de la cellule. D'autres données de séquençage ARN sur les cellules infectées traitées à la Buparvaquone, sont disponibles au laboratoire. Il serait extrêmement intéressant de pouvoir comparer les modifications de l'expression génique de l'hôte engendrées par le traitement Buparvaquone à celles du traitement MC2646. Nous avons établi une liste de gènes différentiellement exprimés entre l'infection (de BL3 à TBL3) et le traitement MC2646 (de TBL3 à TBL3 traitées). Il faudrait à présent faire la même chose pour le traitement Buparvaquone et croiser ces listes afin de découvrir quels gènes sont essentiels à la survie du parasite. Les gènes qui ne sont pas en commun et associés uniquement au traitement MC2646 sont tout aussi importants : ce sont les gènes expliquant la différence de phénotype entre le traitement Buparvaquone et MC2646, et responsables de la survie de la cellule hôte.

Il est plus difficile d'étudier les gènes parasitaires et vérifier leur impact sur l'infection car même si un grand nombre sont impactés par le traitement, nous sommes limités techniquement pour induire une perte de fonction ou une surexpression chez le parasite. Enfin, une étude du protéome comparant les cellules infectées et non infectées et les traitements Buparvaquone et MC2646, permettrait de soutenir les résultats obtenus sur le transcriptome. Relever les protéines surexprimées mais dont la transcription ne varie pas et inversement, les gènes fortement transcrits mais dont la protéine n'est pas enrichie, seront des pistes essentielles pour de prochains travaux visant à comprendre les modifications causées aux niveaux transcriptomique, protéomique et cellulaire de l'interaction hôte-pathogène.

7- La détermination de la cible du composé candidat MC2646

- La technique de « click chemistry » a été très utile pour visualiser la cible du composé *in vivo*. Nous n'avons pas pu utiliser directement le composé « clické » MC4404 comme traitement car il avait un effet cytotoxique sur les cellules après quelques heures de traitement, que nous expliquons par l'ajout du groupement alkyne à MC2646. Cette technique est conjugable à une immunofluorescence, cela a été pratique pour vérifier s'il y avait des colocalisations entre des protéines d'intérêt et la protéine cible de MC2646. Nous avons pu décrire différents profils de sa localisation en fonction du type cellulaire et du traitement MC2646 ajouté ou non aux cellules. Après traitement MC2646, nous avons remarqué que la cible du composé formait comme un anneau autour des parasites restants. Nous n'avions jamais observé un profil comme ce dernier mais nous avons noté qu'il ressemblait étrangement à celui des parasites Apicomplexes lors de leur entrée dans la cellule sanguine, au stade de trophozoïtes jeunes appelé « forme en anneau ». La zone plus condensée correspond à la chromatine parasitaire. Nous nous sommes donc réinterrogés sur la possibilité que la cible du composé MC2646 soit une protéine parasitaire mais la présence de la cible de MC2646 dans des types cellulaires non infectés ne permet pas de soutenir cette hypothèse.

Fig. 55 : Premières étapes de maturation du parasite *Plasmodium falciparum* au sein des cellules sanguines. Figure extraite du site https://moodle.univ-tln.fr/pluginfile.php/80549/mod_resource/content/3/palu.pdf



- Nous avons également utilisé la technologie de « click chemistry » combinée à de la Spectrométrie de masse pour définir la cible du composé MC2646. Nous avons rencontré plus de difficultés dans les expériences *in vitro* car nous ne détectons pas clairement un enrichissement protéique après le pull down du composé. Nous avons donc amélioré les conditions de l'expérience en utilisant un dérivé de MC2646 « clickable et photocrosslinkable » permettant une interaction plus forte entre le composé et sa cible.

Après un tri sur les données : $p\text{value} < 0,05$ et la suppression des protéines enrichies dans la condition du composé « non clickable et photocrosslinkable », qui a servi de contrôle négatif ; nous avons obtenu une liste de 146 protéines potentielles. Nous nous sommes concentrés sur les candidats pouvant avoir un rôle dans l'infection, la tumorigénèse, ou l'autophagie. Nous avons déjà décrit la localisation cellulaire de certaines protéines candidates (cf partie III-4 résultats et partie 9 discussion) comme le complément C3 qui fait partie des meilleurs candidats comme cible de MC2646. Cette protéine a un rôle majeur dans de nombreux processus cellulaires, notamment dans la régulation du système immunitaire. Il a été montré que le complément C3 interagit avec ATG16L1, un composant majeur de l'autophagie.¹⁶⁸ ATG16L1 appartient à un complexe essentiel avec ATG12 et ATG5, responsable de la lipodation de LC3 et la formation de l'autophagosome. Son interaction avec le complément C3 est primordiale pour la fusion des autophagosomes aux lysosomes et à l'activation de l'autophagie dans les cellules. Il serait donc intéressant de tester l'interaction entre C3 et ATG16L1 par IP, dans les cellules infectées par *T. annulata* avec ou sans traitement MC2646.

Une précédente étude chez *T. annulata*, a souligné la potentielle séquestration de eIF5A par le parasite.⁵⁷ Cette protéine a donc aussi été étudiée, elle fait partie des 50 premières protéines obtenues en spectrométrie de masse et montre un enrichissement pour la condition de compétition (protéines avec les plus fortes interactions). De plus, MC2646 a un effet spécifique sur la protéine eIF5A : il entraîne sa libération du parasite vers le cytoplasme de la cellule hôte. Cependant le signal du « click » et celui de eIF5A ne colocalisent pas. (cf partie III-5 résultats et discussion partie 9).

Une autre protéine retrouvée sous plusieurs isoformes, parmi les meilleurs candidats de l'expérience de Spectrométrie de masse, mais aussi présente dans l'étude de séquestration de protéines hôtes par le parasite⁵⁷, est la protéine 14-3-3. La phosphorylation de Beclin1 par AKT inhibe l'autophagie et entraîne la formation d'un complexe entre Beclin-1/14-3-3/vimentine promouvant la tumorigénèse.¹⁶⁹ La protéine 14-3-3 est montrée comme interagissant avec TFEB dans le cytoplasme lorsque celui-ci est phosphorylé par mTOR.¹⁷⁰ Il est possible que MC2646 agisse sur la protéine 14-3-3, libérant ainsi TFEB, qui peut aller dans le cytoplasme et activer l'autophagie. Caractériser la localisation de cette protéine, la comparer avec celle de la cible du composé, puis réaliser des immunoprécipitations entre TFEB et 14-3-3 en présence ou non de MC2646 sont donc une priorité.

- Les prochaines protéines à tester sont les apolipoprotéines notamment A1 et E qui se trouvent au sommet de la liste des cibles potentielles et la protéine SEC63. La littérature indique que les apolipoprotéines, et les protéines SEC ont un lien avec le trafic de biosynthèse du Golgi et surtout du réticulum endoplasmique (RE), étant le centre de rassemblement des acteurs de l'initiation de la biogénèse de l'autophagosome. La protéine ApoA1 est décrite pour augmenter les niveaux d'autophagie en phosphorylant AMPK et ULK1 et en diminuant la phosphorylation de mTOR.¹⁷¹ De plus, ApoE a été montré comme jouant un rôle d'inhibiteur dans la production virale du VIH.¹⁷² Ces protéines pourraient être les cibles que nous recherchons, leurs phénotypes décrits étant similaires aux observations faites chez *T. annulata* après traitement MC2646.

La protéine « Poly(rC)-binding protein 1 », inhibiteur d'autophagie qui entraîne la surexpression de p62 est aussi une candidate intéressante dans notre contexte d'autophagie inhibée par l'infection.¹⁷³ Nous devons également valider les protéines choisies par Immunoprécipitation (IP) du composé et en parallèle par IP de la protéine candidate, en conservant les 3 conditions du pull down : composé parent/photocrosslinkable et compétition entre les deux.

8- L'activation de l'autophagie au sein des cellules infectées via MC2646

L'étude de ce composé, nous a permis d'étudier à plus grande échelle l'interaction hôte-parasite, de trouver de nouveaux phénomènes de séquestration mais également de modification des voies cellulaires. Nous nous sommes interrogés sur le rôle de l'autophagie de l'hôte lors de l'infection par *T. annulata*. Il est possible que la seule façon de ne pas éliminer l'hôte en même temps que le parasite est de réactiver un processus cellulaire bénéfique à l'hôte. *T. annulata* inhibe très certainement l'autophagie pour survivre sans protection dans le cytoplasme, et le traitement MC2646 permettait de réactiver ce processus, en éliminant à la fois le parasite et en redonnant de l'énergie à la cellule. Une autre molécule, la curcumine, a montré des effets similaires sur l'infection à *T. annulata* : elle inhibe la voie mTOR et augmente l'expression de protéines autophagiques ainsi que l'accumulation de LC3B et donc des autophagosomes. Mais elle induit également la production d'espèces réactives à l'oxygène, entraînant l'apoptose des cellules infectées. Le composé *Trifloxystrobine* caractérisé dans le Criblage1, entraîne, lui aussi la mort de la cellule hôte. Il serait intéressant de tester l'impact de ces composés sur le flux autophagique mais surtout de comparer leurs effets à ceux de MC2646 afin de mieux déterminer son mode d'action.

a) *La caractérisation du flux autophagique* : Dire qu'une molécule est activatrice de l'autophagie est un abus de langage car en réalité il faut parler de flux autophagique au sein des cellules. Ce dernier peut être bloqué par des composés comme la BafilomycineA1 et la Chloroquine qui empêchent la fusion entre autophagosome et lysosome bloquant ainsi le flux autophagique. Pour réellement affirmer que MC2646 est un activateur de l'autophagie au sein des cellules infectées par *T. annulata*, il a fallu comparer la quantité d'autophagosomes entre une condition contrôle et une condition où le flux autophagique était bloqué, et ce grâce au marqueur LC3. En arrêtant le flux autophagique, nous avons observé une accumulation d'autophagosomes plus importante qu'en condition contrôle prouvant que le traitement MC2646 stimule la formation de ces derniers et donc l'autophagie. La problématique était ensuite de déterminer si la diminution du nombre de parasites était due à l'induction de l'autophagie ou si la mort du parasite par un processus inconnu entraînait la libération des protéines séquestrées par ce dernier, ce qui re-déclenchait les processus autophagiques. Les résultats préliminaires de cette expérience avec la Buparvaquone semblent montrer qu'en réalité les deux hypothèses sont vraies. En effet, la Buparvaquone n'active pas directement l'autophagie, il n'y a pas d'augmentation de la formation d'autophagosomes quand le flux autophagique est bloqué. Par contre, il y a quand même l'apparition d'autophagosomes comparée à une condition Contrôle non traitée : cela signifie que la perte du parasite réenclenche également une autophagie basale. Globalement, 24H de traitement semble trop long pour analyser le flux autophagique qui est un processus très rapide et qui évolue sans cesse dans le temps, cependant, c'est la durée minimum pour observer le phénotype associé à MC2646 ou à la Buparvaquone sur la survie parasitaire. Idéalement, il faudrait faire une cinétique où le flux autophagique serait bloqué avec de la BafilomycineA1 après 3H, 6H, 9H, 12H...de traitement MC2646, pour par la suite réaliser un comptage parasitaire avec une Immunofluorescence de LC3B et en parallèle un Western blot de LC3B avec un marqueur de la charge parasitaire comme TaPin1. Nous avons pu observer de très rares fois le marqueur LC3 qui englobait ce qu'il restait de parasites car il faut fixer la cellule au bon moment puis ne pas la perdre au cours des étapes de cyospin et IF... Utiliser la technique d'électron microscopie nous a déjà permis de voir des différences structurelles entre cellules infectées (TBL3) et non infectées (BL3) notamment la quasi absence de structures associées à des autophagosomes-lysosomes dans les cellules infectées, qui réapparaissaient après traitement MC2646. Il serait intéressant de réaliser l'expérience du blocage de flux entre cellules infectées contrôles et traitées et d'observer via l'électron microscopie l'apparition d'autophagosomes.

Enfin, réaliser un marquage avec des billes gold de LC3 nous permettrait de voir si LC3 est retrouvé autour de la structure parasitaire après traitement MC2646.

b) *L'étude des profils de LC3B :*

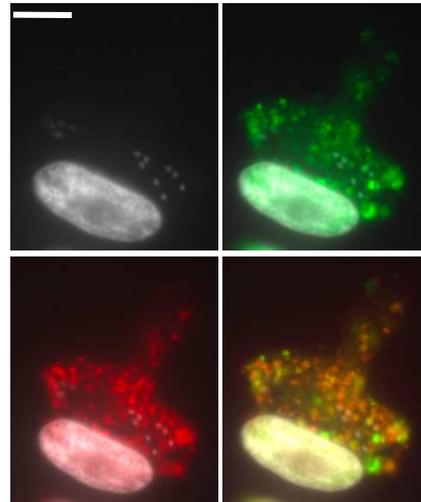
- Dans un premier temps, les expériences d'immunofluorescence de LC3B étaient réalisées avec une fixation PFA et non méthanol : le signal LC3 se trouvait autour du syncicium parasitaire. C'est également le cas chez *P. falciparum*¹⁴², il serait d'ailleurs intéressant de trouver une protéine équivalente à UIS3 chez *T. annulata*. Avec une fixation méthanol, des structures appelées LC3-puncta correspondant aux autophagosomes sont observées. Ces structures sont très présentes dans les cellules non infectées (BL3), traitées ou non avec MC2646. Les LC3 puncta sont absents dans les cellules infectées TBL3 et retrouvés après traitement MC2646. Ces résultats en immunofluorescence sont corroborés par les Western blot de LC3, qui montrent clairement qu'il n'y a pas de formation d'autophagosome dans les cellules infectées et que cela est à nouveau possible après traitement MC2646.

- Afin d'observer le signal click combiné à celui de LC3B, une double fixation méthanol puis PFA a été réalisée, malheureusement le signal de click n'a pas pu être observé dans cette condition. Cependant, il a été très surprenant de voir que dans les conditions Contrôle et Buparvaquone, le signal de LC3 était très conservé au niveau du parasite avec quelques rares LC3-puncta alors qu'après le traitement MC2646 un grand nombre de LC3-puncta sont présents et très peu de signal reste au niveau du parasite. C'est peut-être la forme LC3-I qui est séquestrée au niveau du parasite et quand le flux autophagique est activé notamment grâce à MC2646, la formation de LC3-II est à nouveau possible et comme le reflète la quantité des LC3-puncta/autophagosomes. Nous avons donc tenté de réaliser une perte de fonction de LC3 avec un siLC3 au sein des cellules infectées. Le but était de déterminer la spécificité du signal observé en IF, et la conséquence de l'absence d'autophagosome sur l'infection. Malheureusement des problèmes techniques de neontransfection ne nous ont pas permis de conclure clairement sur ce point.

- Aussi, nous avons pu remarquer que lorsque les cellules étaient traitées avec de la Chloroquine pour bloquer le flux autophagique, malgré la fixation PFA des cellules, cela forçait de manière tellement importante l'accumulation d'autophagosomes que le signal LC3B était complètement délocalisé du parasite dans le cytoplasme de la cellule et le signal de Click subissait la même délocalisation. Il semblerait donc qu'en bloquant le flux autophagique et en forçant l'accumulation des autophagosomes, la cible de MC2646, ainsi que la protéine LC3, soient déplacées au niveau des autophagosomes.

Il serait intéressant de reproduire cette expérience avec une fixation méthanol de LC3B afin de mieux observer les autophagosomes et si la cible de MC2646 colocalise avec ces derniers.

Fig. 56 : Effet d'un long traitement Chloroquine sur le profil de LC3B et « click », cible de MC2646. Images de lymphocytes B infectés par *T. annulata* ayant subi un traitement Chloroquine 1uM, 24H, suivi d'une immunofluorescence de LC3B (après fixation PFA) marqué en vert et d'une réaction de Click Chemistry du composé MC4404, marqué en rouge. Scale bar 5µm.



- Un ultime test avec LC3B fixé en Méthanol a été réalisé dans les macrophages infectés Tac12. Cette lignée cellulaire ayant la protéine Clasp1 marquée en GFP, permet de voir le syncidium parasitaire. Il y a quelques rares autophagosomes dans les cellules contrôles, après traitement MC2646, nous remarquons non seulement l'augmentation des LC3-puncta mais aussi certaines cellules dont le signal LC3B colocalise parfaitement avec le Clasp1-gfp. Le signal LC3B englobe entièrement les parasites restants et ressemble fortement au signal de click MC4404 avec la même forme de bague. Ce résultat préliminaire semble suggérer que le parasite serait éliminé par les mécanismes autophagiques après traitement MC2646, mais cette expérience doit être reproduite.

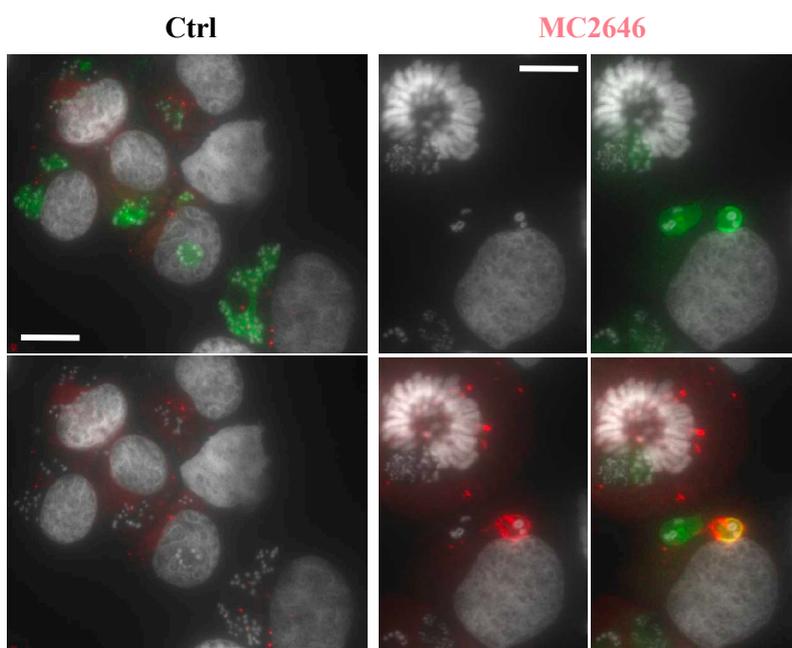


Fig. 57 : LC3B englobe les parasites après traitement MC2646. Immunofluorescence de LC3B, après fixation méthanol, (marqué en rouge) dans les Tac12. Ces cellules ont déjà un marquage GFP de la surface parasitaire. Après traitement MC2646(4uM, 24H), il y a une colocalisation du signal entre les parasites restants et LC3B sur certaines cellules. Scale bar 10µm(Ctrl); 5µm (MC2646)

- L'utilisation du LysoTracker combinée au traitement MC2646 entraînait la perte totale du signal LysoTracker qui semblait très désorganisé dans les cellules infectées. Le signal du LysoTracker est dépendant du pH acide, si ce dernier varie suite aux modifications engendrées par le traitement dans la cellule infectée, il serait donc plus pertinent d'utiliser LAMP1 comme marqueur lysosomal. Il faudrait donc réaliser d'autres expériences en combinant LC3 ou le « click » avec LAMP1 ce qui permettrait de déterminer si MC2646 active réellement le flux autophagique jusqu'à la fin du processus et entraîne la fusion entre autophagosomes et lysosomes.

c) *L'utilisation d'inhibiteurs et activateurs de l'autophagie* : les molécules connues pour activer ou inhiber la voie autophagique n'ont pas donné de réels résultats dans nos conditions. La rapamycine1, caractérisée pour inhiber la voie mTOR et déclencher l'autophagie n'a pas montré d'effet sur la survie parasitaire ni même sur les Western blot de LC3B. Seul l'activateur de AMPK, le composé 991, a entraîné la phosphorylation de AMPK associée à une légère diminution du nombre de parasites par cellules hôtes. Priver les cellules de nutriments en les incubant dans un milieu pauvre en acides aminés (milieu EBSS), va déclencher l'autophagie. Si ce processus est responsable de l'élimination parasitaire, alors il devrait y avoir une diminution de la survie parasitaire après incubation des cellules infectées dans ce milieu. Cependant nous avons remarqué que lorsque la cellule infectée est soumise à un stress, il y a une augmentation du nombre de parasites par cellules hôtes, ce qui risque de fausser le résultat. Parmi les inhibiteurs d'autophagie, la Chloroquine et la BafilomycineA1, ont des effets assez complexes et nuancés sur l'autophagie. Deux processus contrastés semblent se produire : ils inhibent le flux autophagique impactant la formation des lysosomes mais en parallèle activent la voie AMPK et inhibent la voie mTOR, ce qui permet l'expression de TFEB et des gènes lysosomaux associés à ce facteur de transcription. Il est possible que MC2646 se comporte comme ces deux composés. Bien qu'une augmentation de LC3-II ait été observée en bloquant le flux autophagique, nous n'avons pas vraiment de résultats clairs sur l'état des lysosomes au sein des cellules infectées, traitées ou non par MC2646. En effet, le signal LysoTracker semblait désorganisé dans les cellules infectées et absent après traitement MC2646, il faudrait donc utiliser un marqueur lysosomal comme LAMP1 pour caractériser l'activité lysosomale. Cependant, les résultats préliminaires avec le plasmide LC3 RFP-GFP montrent l'apparition de corps rouges signifiant qu'il y a eu une fusion entre l'autophagosome et le lysosome, le pH acide du lysosome inhibant la fluorescence GFP.

Le flux autophagique, suite au traitement MC2646, semble donc fonctionner à chaque étape clé de ce processus cellulaire : la formation de l'autophagosome puis la fusion au lysosome.

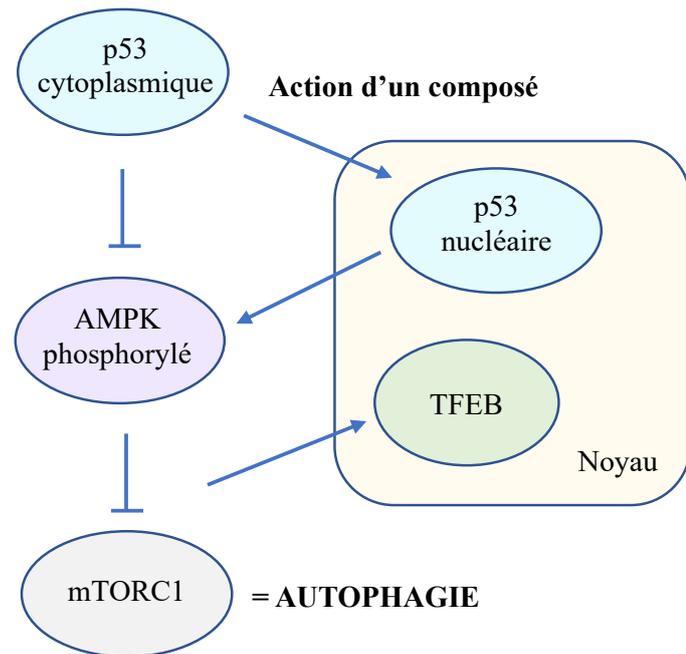
Il faudrait également vérifier par des expériences de qPCR le niveau d'expression des gènes clés de l'autophagie comme TFEB, p62, ULK1, BCN1 ; ainsi que leurs états de phosphorylation, synonyme d'activation. Beclin1 est down-régulé au cours de l'infection et up-régulé par le traitement MC2646. Il serait donc intéressant de faire une perte de fonction de Beclin1 ou ULK1 dans les cellules infectées et de déterminer les conséquences sur la survie parasitaire. De plus, Beclin1 a une interaction importante dans la régulation de l'autophagie avec BCL2. Lorsque Beclin1 interagit avec BCL2, l'autophagie est réprimée.¹⁷⁴ Dans les cellules infectées par *T. annulata*, les niveaux d'expression de l'oncogène BCL2 sont élevés, il interagit certainement avec Beclin1 pour bloquer l'autophagie. Le traitement MC2646 entraîne la diminution de l'expression de BCL2, l'augmentation de celle de Beclin1, qui peut alors promouvoir l'autophagie. Nous pourrions confirmer cette interaction dans notre modèle cellulaire par co-immunoprécipitation et définir la localisation *in vivo* de Beclin1 par immunofluorescence.

d) *L'activation de la voie AMPK* : Contrairement à mTOR, un inhibiteur de l'autophagie souvent associé à des dysfonctionnements lysosomaux, la voie AMPK active l'autophagie. Nous avons montré que AMPK était phosphorylé et donc activé suite au traitement MC2646, et que l'activateur connu de cette voie (991) avait une tendance à diminuer la survie parasitaire. Nous devons à présent vérifier que l'activation de la voie AMPK par le traitement MC2646 est responsable du phénotype de MC2646. Pour cela, il faudrait bloquer la phosphorylation de AMPK, ce qui empêcherait la phosphorylation de ULK1 puis de Beclin1 et donc la formation de l'autophagosome. Si dans cette condition MC2646 diminue toujours la charge parasitaire, cela signifie que l'élimination du parasite ne se fait pas via la voie AMPK.

L'activation de AMPK permet l'inhibition de mTOR et donc la libération de facteur de transcription TFEB qui peut alors transloquer du cytoplasme au noyau. Nous avons observé une perte cytoplasmique du signal TFEB mais pas d'augmentation du signal dans le noyau. Nous pourrions donc réaliser des Western blot pour extraire les fractions cytoplasmiques et nucléaires et observer le passage de TFEB, mais aussi d'autres protéines comme p53, du cytoplasme au noyau. Pour confirmer que mTOR a bien été inhibé et que TFEB est dans le noyau de la cellule hôte, il faudra analyser les niveaux d'expression des gènes cibles de TFEB comme Beclin1, p62 et LAMP1.

Une étude a également montré le lien entre la localisation de la protéine p53 et son impact sur l'autophagie. Si p53 est séquestré dans le cytoplasme, la voie AMPK est inhibée, mTOR est activé et il n'y a pas d'autophagie. Au contraire, quand p53 devient nucléaire, il induit la transcription de gènes pro-autophagiques incluant la SESN2, active AMPK en la phosphorylant et déclenche l'autophagie.^{103,175,176} Dans les cellules infectées par *T. annulata*, p53 est séquestré par le parasite donc sa localisation cytoplasmique joue dans l'inhibition de l'autophagie orchestrée par le parasite.

Fig. 58 : *Modèle d'induction de l'autophagie via la translocation nucléaire de p53 et TFEB. P53 permet l'activation de AMPK qui en inhibant mTOR libère TFEB qui peut aller dans le noyau et permettre l'expression de gènes associés à l'autophagie. Figure inspirée de l'article de Kim SM et al. » Sinensetin induces autophagic cell death through p53-related ampk/mTOR signaling in hepatocellular carcinoma hepg2 cells ».*



P. falciparum se protège de l'autophagie en séquestrant la protéines LC3 à sa surface et dans cette condition, la protéine AMPK n'est pas phosphorylée et l'autophagie n'est pas activée. Lorsque la charge parasitaire réduit, LC3 est libéré, AMPK est phosphorylée et l'autophagie est activée.¹⁴⁴ Cela montre que les Apicomplexes ont la capacité de séquestrer des acteurs primordiaux de l'autophagie mais aussi de bloquer ce processus cellulaire, via la voie AMPK, au profit de l'infection.

9- Les différents profils de séquestration parasitaire

La balance entre l'agent pathogène et l'autophagie de l'hôte est un équilibre précaire, elle peut tout autant lui être bénéfique, que délétère ; l'agent pathogène peut donc séquestrer certains composants pour bloquer l'autophagie mais tout aussi bien pour s'en servir à son avantage. Nous avons pu découvrir au cours de cette étude un grand nombre de protéines hôtes séquestrées au parasite en plus de celles déjà connues comme CLASP1, P53, IKK, CD2AP... Les protéines testées ont été découvertes suite à l'expérience Spectrométrie de masse.

Certaines sont associées à des processus autophagiques : c'est le cas du Complément C3 et de ATG16L1 dont l'interaction est essentielle pour l'autophagie¹⁶⁸. En réalisant une IF de ATG16L1, combinée au composé « click », nous avons pu voir que ces protéines étaient elles aussi séquestrées par le parasite. Le complément C3 se trouve plutôt à la membrane du schizonte et ATG16L1 est présente entre les noyaux parasitaires. ATG16L1 ne colocalise pas avec la cible de MC2646 ou avec mAB414, au sein des « annulate lamellae », même après traitement MC2646, mais ces expériences doivent être reproduites. (Cf Annexe 3) D'autres protéines issues du pull down du composé comme 14-3-3, la protéine Importine 7, Poly(rC)-binding protein 1, ou certaines Apolipoprotéines (A1, E) doivent être tester pour déterminer leur localisation cellulaire au cours de l'infection. Une protéine comme MAP4, associée aux microtubules serait également intéressante à étudier car elle pourrait, comme CLASP1, aider *T. annulata* à se diviser. D'autant plus qu'un lien fonctionnel crucial a été établi entre Clasp1 et MAP4 pour le bon déroulement de la mitose et le maintien dans la bonne position du fuseau mitotique.¹⁷⁷

La protéine eIF5a et la cible du composé MC2646 semblent séquestrées par le parasite. Nous avons décrit dans l'introduction Partie I-4b, des membranes poreuses associées à la surface du schizonte appelées « annulate lamellae » (AL). Nous nous sommes demandés si les protéines séquestrées pouvaient se trouver dans ces structures. Nous avons utilisé un marqueur des pores nucléaires mAB414 pour déterminer si eIF5A et la cible de MC2646 étaient dans ces AL. Une immunofluorescence de mAB414 combinée avec une immunofluorescence de eIF5A ou le composé « click », a montré que ces protéines ne se trouvent pas dans les AL (Cf Annexe 3). Cela confirme que la protéine eIF5A et la protéine cible de MC2646 sont séquestrées au parasite à une localisation et via des mécanismes qui nous sont encore inconnus. Le mode d'action précis de MC2646 reste encore à définir, une hypothèse serait qu'il entraîne la libération de eIF5a dans le cytoplasme de l'hôte et pourrait participer à l'induction de l'autophagie dans les cellules infectées. Cette libération de eIF5A dans le cytoplasme de la cellule hôte est spécifique au traitement MC2646 et non à la mort parasitaire (buparvaquone n'a pas cet effet). eIF5A joue un rôle important pour l'induction de l'autophagie via TFEB : quand la protéine eIF5a est hypusinée, le gène TFEB est davantage traduit.¹⁶¹ Il faudrait vérifier les niveaux d'expression puis de traduction de TFEB sur des cellules infectées contrôles, et traitées MC2646-Buparvaquone-GC7-Spermidine. A l'avenir, il sera également intéressant de tester le statut de l'hypusination au sein des cellules non infectées BL3.

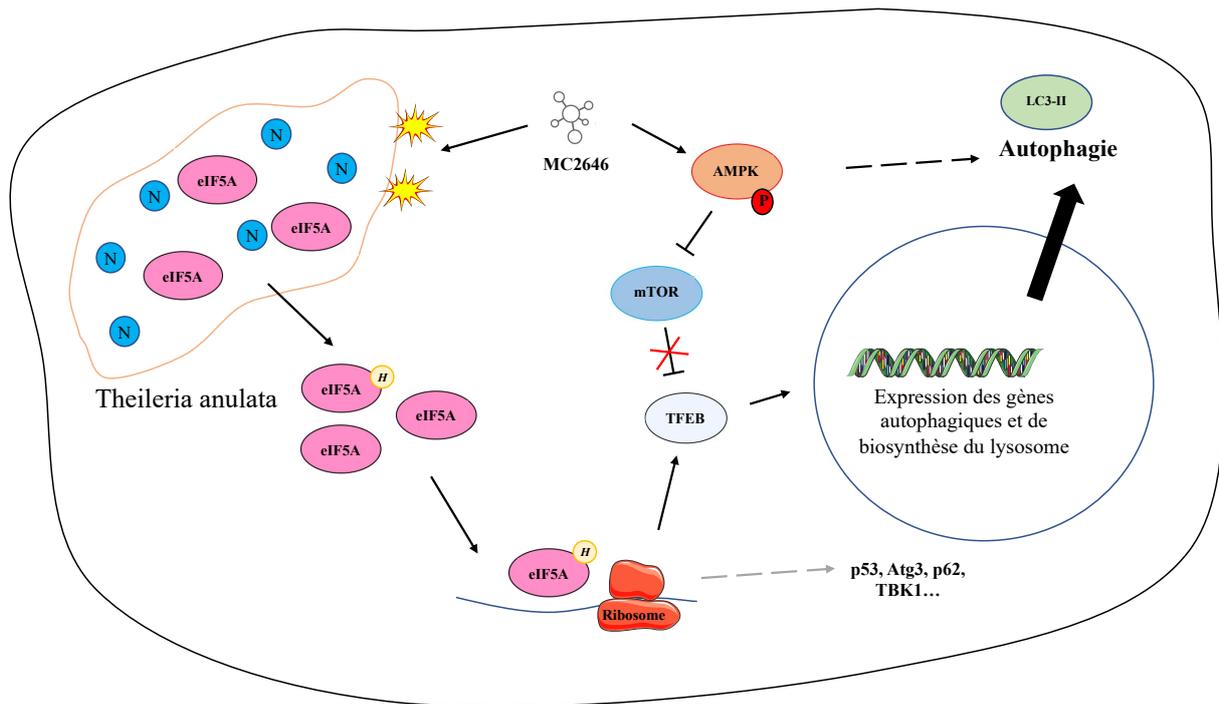


Fig. 59 : Modèle proposé pour le rôle du traitement MC2646. La protéine eIF5A est séquestrée par le parasite à côté des noyaux parasitaires. Uniquement le traitement des cellules infectées avec MC2646 entraîne la libération de eIF5A dans le cytoplasme de la cellule hôte agissant ensuite sur la traduction (entre autres) de TFEB. MC2646 active également la voie AMPK, ce qui inhibe mTOR et permet à la translocation de TFEB du cytoplasme au noyau. Cela permet l'expression de gènes associés à l'autophagie, et notamment à la biosynthèse lysosomale.

Le rôle de l'hypusination est multiple car l'inhibition de l'hypusination de eIF5A réduit également la traduction de la protéine p53.¹⁷⁸ eIF5A a aussi été montré comme régulant la traduction de nombreuses autres protéines de l'autophagie comme ATG3, p53, p62 ou encore TBK1.¹⁶⁰

Nous avons caractérisé 3 profils de séquestration des protéines de l'hôte au niveau du parasite. Il y a les protéines à la surface du schizonte et celles entre les noyaux parasitaires, bien que proches de la surface, dans les « annulate lamellae ». Le troisième type de signal, est celui de la cible de MC2646, et de eIF5A, qui est fort et concentré en points à côté des noyaux parasitaires. Ces protéines sont peut-être séquestrées dans des structures encore inconnues. Après traitement MC2646 ces profils évoluent, le click passe de points concentrés à côté des noyaux parasitaires à un anneau autour des parasites restants. Ce signal se retrouve à l'intérieur du signal des protéines caractérisées comme étant à la surface du schizonte comme Clasp1, CD2Ap... (cf Annexe 3)

Ce qui distingue les deux autres signaux, c'est que certains sont plus diffus entre les noyaux parasites, dans les structures « annulate lamellae » et n'évoluent pas après traitement MC2646. Les signaux équivalents à celui de la cible de MC2646 dans la condition contrôle, sont relargués dans le cytoplasme de la cellule hôte après traitement MC2646 et peuvent relancer des processus pour éliminer le parasite comme c'est le cas pour eIF5A et l'autophagie.

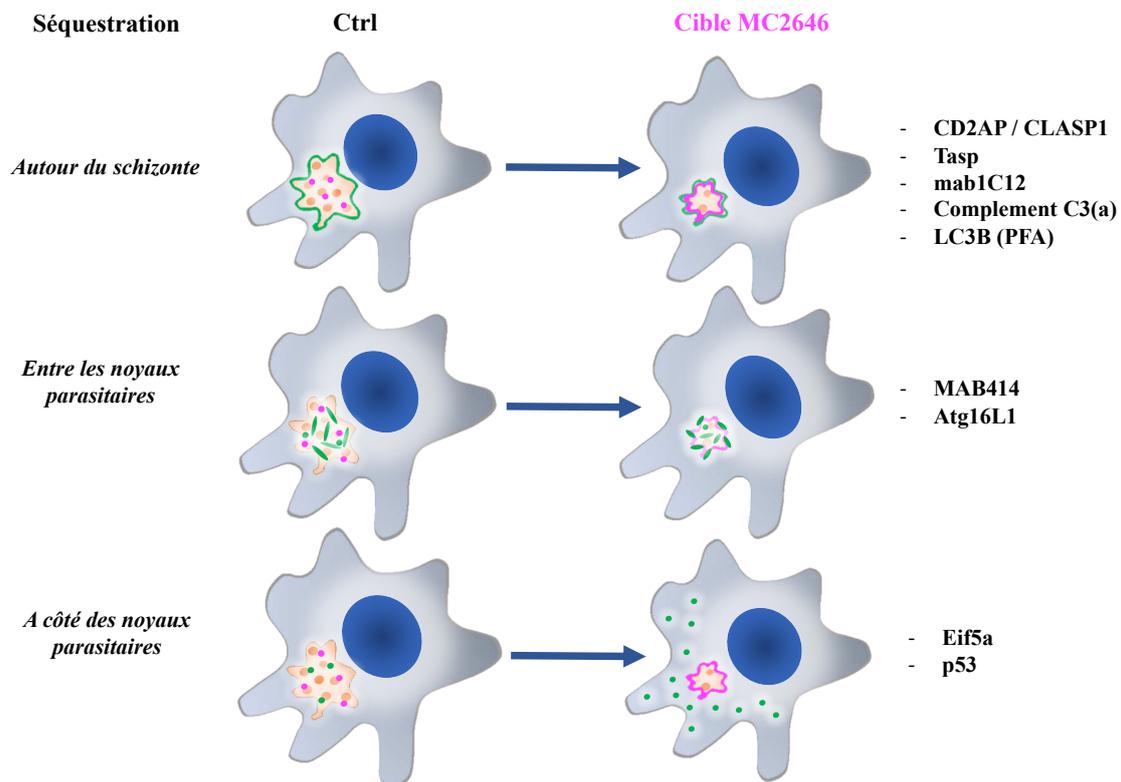


Fig. 60 : Les différents profils de séquestration des protéines hôtes par le parasite. Le parasite est représenté en orange, la cible de MC2646 est en rose et les protéines séquestrées sont en vert. Ces profils évoluent après le traitement MC2646

10- L'utilisation de nouvelles molécules ciblant l'épigénétique : les traitements de l'avenir

Le composé MC2646 a des effets inédits et prometteurs sur les cellules infectées par *T. annulata*. Nous pouvons supposer qu'il cible « l'interaction hôte-pathogène » et pas uniquement le parasite. Les traitements à davantage développer sont ceux qui ciblent les processus essentiels dont se sert l'agent pathogène pour survivre, ce qui entraînera indirectement sa mort. MC2646 réactive le processus physiologique de l'autophagie permettant d'éliminer le parasite tout en fournissant de l'énergie à la cellule hôte.

L'autophagie ayant aussi un rôle dans le cancer, sa réactivation pourrait participer à la diminution du phénotype transformant. *T. annulata* inhibe l'autophagie de l'hôte, et plusieurs études ont montré que cela participe à l'initiation du phénotype cancéreux.¹⁷⁹

Le mode d'action précis du traitement MC2646 est un processus qu'il faut encore déterminer, mais ce traitement cause une forte diminution de la survie parasitaire, et les cellules hôtes sont moins transformées et capables de se diviser, même dépourvues de parasites. Nous souhaitons déposer un brevet sur l'utilisation de cette molécule contre le pathogène *T. annulata*. Il faudra dans un premier temps, réaliser des tests cliniques sur des bovins et vérifier l'efficacité, la toxicité, la tolérance et la relation effet-dose. Cela sera possible grâce à des collaborations avec des vétérinaires du Moyen Orient. Ensuite le dépôt de brevet doit être fait auprès de l'Institut national de propriété industrielle (INPI). Pour étendre l'utilisation de cette molécule, il faudrait déterminer le mode d'action de MC2646 dans d'autres types cellulaires et d'autres systèmes : est-il un activateur global de l'autophagie ou seulement dans les cellules infectées par *T.annulata* ? Diminue-t-il l'état transformé au sein d'autres cellules cancéreuses ?

L'utilisation d'un criblage de nouvelles molécules est une technique en pleine expansion car les banques de composés ne cessent d'augmenter et leurs utilisations peuvent être multiples. Pour étudier l'interaction hôte-pathogène, nous avons repositionné des molécules déjà connues dans d'autres infections ou pour leurs effets contre le cancer, et nous avons trouvé dans chacune de ces bibliothèques des composés impactant la survie *T. annulata*. Cela souligne également l'omniprésence de l'épigénétique dans de nombreux organismes qu'il reste encore à caractériser, comprendre afin de pouvoir agir sur la régulation génique via les acteurs épigénétiques. Ces nouvelles classes thérapeutiques de molécules peuvent avoir un rôle dans tous types de maladies ou d'infections, elles sont très prometteuses mais très peu vont jusqu'à l'essai clinique. L'avenir sera de combiner nos savoirs en génétique et en épigénétique, mais aussi ces nouvelles molécules avec celles déjà existantes, afin d'avoir une vue globale d'une pathologie et pouvoir la soigner au mieux.

L'avenir de la médecine tend vers les traitements épigénétiques et ciblés à une pathologie. Notre génome est extrêmement similaire mais l'épigénome, même entre des jumeaux est très différent. Ces molécules ciblant l'épigénétique vont permettre de développer une médecine personnalisée, et donc beaucoup plus efficace. De plus, ces composés sont décrits pour atteindre et agir très rapidement sur leurs cibles malgré des problèmes de spécificité d'action pouvant causer des soucis de toxicité. Pour une meilleure efficacité, il faudrait combiner différentes techniques, une pour déterminer la molécule efficace et l'autre pour l'adresser spécifiquement à son lieu d'action.

Annexes

ANNEXE 1: Revue “The clever strategies used by intracellular parasites to hijack host gene expression” dans « Seminars in Immunopathology »

Seminars in Immunopathology
https://doi.org/10.1007/s00281-020-00779-z

REVIEW



The clever strategies used by intracellular parasites to hijack host gene expression

Marie Villares¹ · Jérémy Berthelet¹ · Jonathan B. Weitzman¹

Received: 22 November 2019 / Accepted: 1 January 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Intracellular pathogens need to develop sophisticated mechanisms to survive and thrive in the hostile environment within host cells. Unicellular, eukaryotic parasites from the Apicomplexa phylum have become masters of manipulating their host cells, exploiting signaling, and metabolic pathways to hijack host gene expression to their own advantage. These intracellular parasites have developed a wide range of strategies that affect transcriptional machineries and epigenetic events in the host cell nucleus. In recent years, many laboratories have risen to the challenge of studying the epigenetics of host-pathogen interactions with the hope that unraveling the complexity of the mechanisms involved will provide important insights into parasitism and provide clues to fight infection. In this review, we survey some of these many strategies that Apicomplexan parasites employ to hijack their hosts, including inducing epigenetic enzymes, secreting epigenators into host cells, sequestering host signaling proteins, and co-opting non-coding RNAs to change gene and protein expression. We cite selected examples from the literature on Apicomplexa parasites (including *Toxoplasma*, *Theileria*, and *Cryptosporidium*) to highlight the success of these parasitic processes. We marvel at the effectiveness of the strategies that these pathogens have evolved and wonder what mysteries lie ahead in exploring the epigenetics of host-parasite interactions.

Keywords Epigenetics · Parasites · Lysine methylation · Host-parasite interactions · Epigenators · Apicomplexa

The dynamics of host-parasite interactions: amazing Apicomplexa

All pathogens exploit resources from their hosts to maximize their own survival, replication, and dissemination. Many pathogens (be they bacteria, viruses, or parasites) have developed sophisticated strategies to hijack the host cellular machineries in order to inhibit defense responses, such as apoptosis and inflammation. Parasites of the Apicomplexa phylum have become masters of host manipulation, and they account for much of the infection mortality around the world. Apicomplexa are particularly versatile unicellular,

intracellular parasites that include several virulent pathogens with fascinating biology and unique ability to modify cellular processes in their hosts. These pathogens have attracted much interest because of their devastating impact on human and animal health. Moreover, recent studies have revealed many insights into their unique mechanisms for entry in the host cells, their intriguing life and cell cycles, and their remarkable ability to manipulate signaling pathways and gene regulatory circuits in their host cells [1]. In this review, we discuss different strategies that intracellular parasites have evolved to manipulate host epigenetics and gene expression programs.

The phylum Apicomplexa consists of thousands of species of unicellular organisms that infect a broad range of hosts including invertebrates (from insects to mollusks) and vertebrates (from farm animals to humans) [Fig. 1]. Apicomplexans are characterized by apical structures that include the cytoskeletal organizing conoid and secretory organelles (rhoptries and micronemes). Perhaps, the most notorious apicomplexan is the human parasite *Plasmodium falciparum* which causes malaria, a potentially deadly disease transmitted to man by mosquito vectors [2]. *Plasmodium* exploits multiple redundant pathways to invade erythrocytes, with two families

This article is a contribution to the special issue on Infection-induced epigenetic changes and the pathogenesis of diseases - Guest Editor: Nicole Fischer

✉ Jonathan B. Weitzman
jonathan.weitzman@u-paris.fr

¹ UMR 7216 Epigenetics and Cell Fate, CNRS, Université de Paris, Bâtiment Lamarck, Case 7042, 35 rue Hélène Brion, 75205 Paris cedex 13, France

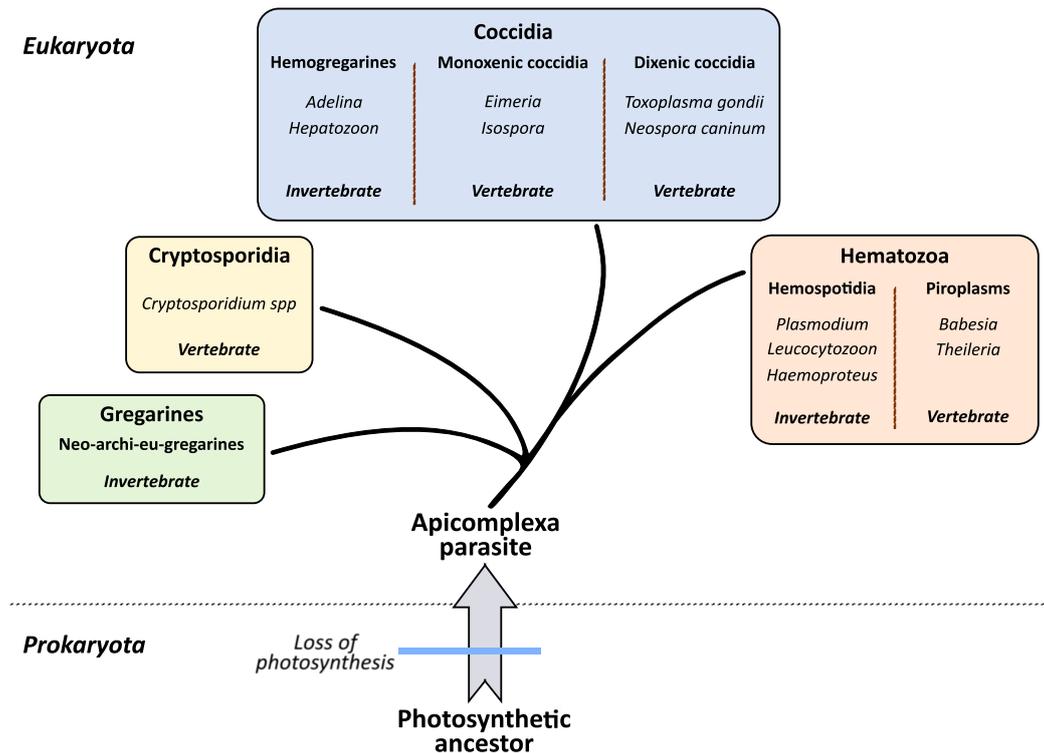


Fig. 1 Apicomplexa phylum is a large assortment of single-cell eukaryotic organisms able to infect vertebrate and invertebrate hosts

of parasite protein, the Duffy binding-like (DBL) family and the reticulocyte homology (PfRh) family, playing key roles in invasion. *Plasmodium* parasites express variant molecules at the surface of infected red blood cells to escape the immune system and persist during blood stages. The genius of *Plasmodium* hinges on the antigenic variations of PfEMP1 surface molecules, encoded by approximately 60 *var* genes and switching of single *var* gene expression [3, 4]. This “Trojan horse” strategy allows parasitized erythrocytes to escape immune system and adhere to microvasculature triggering the disease. In contrast to vector-borne *Plasmodium*, other disease-causing apicomplexan parasites can be transmitted to mammalian hosts directly through food or water contamination and cycles of oral-fecal spreading. Examples include the cyst-forming coccidians, such as *Toxoplasma* which causes toxoplasmosis in humans following transmission by domestic animals, especially cats [5]. *Cryptosporidium* coccidian parasites are a major cause of diarrhea in developing countries. They affect humans and animals following ingestion of oocysts in fecally contaminated food or water. In immunocompromised patients, cryptosporidiosis is a chronic potentially life-threatening diarrhea disease, whereas infections can also be asymptomatic.

The *Theileria* species of Apicomplexa are particularly masterly manipulators of host cell states. Two *Theileria* species *T. parva* and *T. annulata* are bovine-specific pathogens that

cause disease with significant economic impact due to animal mortality and decreased bovine productivity. Infection by *Theileria* causes a lymphoproliferative disease in cows with clinical features similar to some human leukemia. *T. annulata* infects mainly bovine B cells and macrophages, whereas *T. parva* infects bovine B and T lymphocytes. *Theileria*-infected cells are transformed and immortalized; they display uncontrolled proliferation in vitro, independent of exogenous growth factors, and increased ability to migrate and form metastases in immunodeficient mice [6, 7].

Each of these parasites has a different dynamic of host interaction, vector transmission, and parasite sexual life cycle. Furthermore, the biology of the intracellular parasites has significant impact on the interaction with host cell machineries. For example, the intracellular *Toxoplasma* parasites reside within a parasitophorous vacuole (PV) formed from the host plasma membrane [8]. The PV confines the intracellular parasites, preventing direct interacting with host cytosolic proteins and obliging the development of a complex system of protein secretion to deliver parasite effector proteins, such as the rhoptry proteins (ROP) and dense granules proteins (GRA) [9], that target host machineries [10, 11]. In stark contrast, *Theileria* parasites are not surrounded by a membranous PV but reside in the host cell cytosol, in a multicellular schizont structure that is attached to the microtubule network and facilitates direct contact host cell pathways. *Theileria* parasites

sequester host cell proteins and signaling complexes to the schizont surface to generate a “signalosome” that activates signaling cascades [12, 13]. These specific features of the different apicomplexan parasites have obvious consequences for the strategies that the parasites might employ to impact host cell gene regulatory pathways. Many reviews have described in detail the features of these individual parasites and how they interact with host cell signaling pathways [5, 6, 10, 14, 15]. Here, we chose to focus on the host epigenetic mechanisms that are affected by parasite infections and to elaborate a conceptual speculation about the strategic approaches that different parasites develop [12, 16, 17]. There are parallels with host cell manipulation by other pathogens such as bacteria and viruses. Analysis of the different strategies that parasites use offers interesting insights into the mechanisms underlying pathogen infections and may eventually highlight potential anti-microbial drug targets. Rather than an exhaustive catalog of host–parasite interaction mechanisms, we have chosen specific examples to highlight the parasite strategies of host cell manipulation.

The epigenetic machinery and molecular mechanisms of epigenetic events

Gene expression is regulated by a concerted functional interplay between DNA-binding transcription factors and epigenetic modifications that coordinate the genome accessibility and functional output. Epigenetic mechanisms have been defined as “modifications transmissible between generations, without impacting nucleotide DNA sequence.” Much work over the last couple of decades has shown how epigenetic mechanisms regulate cellular states, define cellular differentiation programs, and contribute to our understanding of how environmental cues are integrated to coordinate gene expression programs. These mechanisms work at different levels, regulating processes such as gene expression, DNA repair, genome replication, etc. Epigenetic factors can impact the organization of nuclear DNA in terms of chromatin conformation and chromosomal architecture. In eukaryotic cells, DNA is wrapped around a nucleosome structure composed of core histone proteins (Histones H2A, H2B, H3, and H4). This spatial organization has consequences on the local compaction of the genome and the accessibility to DNA-binding transcription factors and subsequent transcriptome output. For example, open chromatin (“euchromatin”) is linked to active gene expression and correlates with specific, activating epigenetic modifications. In contrast, closed “heterochromatin” is less accessible to transcription factors and restricts gene expression [18] [Fig. 2].

The epigenetic toolbox includes direct covalent modification of the DNA molecule itself, such as methylation of the cytosine nucleotides which leads to repression of gene

promoters [19]. Indeed, DNA methylation changes induced by parasite interactions have been reported in some cases, for example infection by *Leishmania* parasites [16]. Interestingly, methylation is not restricted to DNA; for example, N⁶-Methyladenosine (m⁶A) is an epigenetic modification of RNA that is attracting much attention, inspiring the emerging field of “epi-transcriptomics” [20]. For the moment, RNA modification has not yet been reported as a mechanism of apicomplexan host manipulation, even though parasites may have the potential to use this RNA methylation mechanism to regulate their own genomes, as recently described in *P. falciparum* [21, 22]. The chance of an epi-transcriptomic strategy to modify host cells is an exciting possibility that merits exploration. But, methylation epigenetic modifications are not restricted to nucleic acids; methylation of the lysine residues in the N-terminal sequences of the histone proteins is one of a whole plethora of post-translational modifications (PTM) that regulate gene expression. These include acetylation, phosphorylation, ubiquitination, and other modifications of residues in the histone tails that protrude from the nucleosome structure. Epigenetic modifications can also occur on histone core residues, these can affect nucleosome-DNA interactions and the regulation of gene expression [23]. Interestingly, H4K31 modifications were reported in apicomplexan parasites; they live at the nucleosome lateral surface close to the DNA and may affect genome function [24]. Histone modifications can be stably maintained but are also potentially reversible and dynamics, thereby contributing to chromatin remodeling processes that affect transcription, DNA replication, DNA repair, etc. These PTMs of residues (e.g., Arginine, Threonine, Serine, and Tyrosine) in the histones constitute the “epigenetic code” influencing chromatin structure and local gene expression [25]. Lysine methylation, in particular, is emerging as a versatile and dynamic PTM that contributes critically to cellular differentiation programs [26]. Much attention has focused on the role of histone methylation on lysine residues and their contribution to epigenome manipulation upon cell fate changes and in response to environmental cues. The human genome encodes about 50 lysine methyltransferases (KMTs) that “write” the methylation code, and 20 lysine demethylases (KDMs) that act as “erasers.” Many histone lysine methyltransferases in mammalian genomes contain a characteristic “SET domain”, initially described in Su (var), Enhancer of Zeste and Trithorax proteins [27]. KDM erasers that can reverse histone methylation include two families, called LSD1 (lysine specific demethylase 1) and Jumonji-containing domain (Jmj-C). Nuclear proteins with specific binding modules can “read and translate” the methylome into gene expression responses. These enzymes transfer methyl groups from S-adenosylmethionine (SAM) to generate lysines that can be mono-, di-, or trimethylated offering a range of molecular states with distinct effects [28].

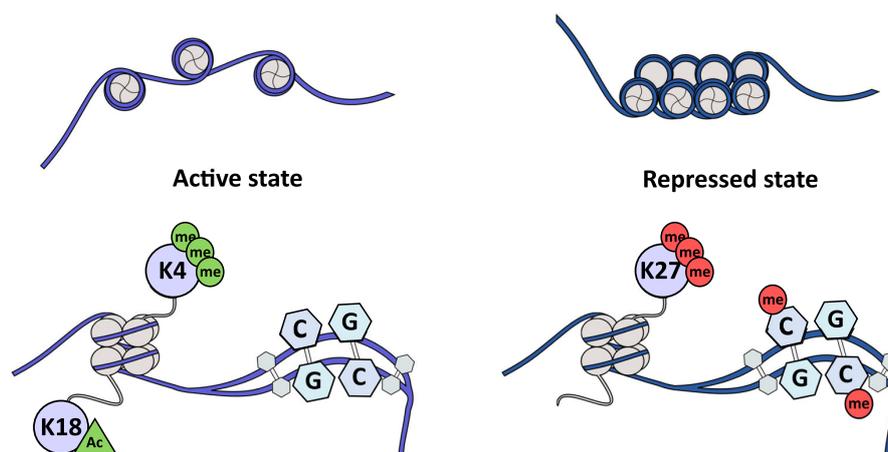


Fig. 2 Chromatin state is a key process of gene regulation. Epigenetic modifications regulate chromatin states: Open chromatin is characterized by active histone methylation marks (such as H3K4me3 or H4K20me), acetylated histone tails (such as H3K18Ac), and unmethylated DNA, which together lead to an active transcriptional state; in contrast,

condensed heterochromatin corresponds to a repressed transcriptional state characterized by repressive histone methylation marks (such as H3K9me3 or H3K27me3), deacetylated histone tails, and methylated DNA in the context of CpG dinucleotides

The literature is full of examples of misregulation of KMTs and KDMs in cancer, driving an intense search for specific small-molecular inhibitors [26]. Yet, much less is known about the role of these proteins (methylation writers, readers, or erasers) in infectious diseases or host-pathogen interactions. Furthermore, the growing collection of inhibitory drugs offers an untapped arsenal to develop anti-parasite treatments.

In addition to DNA/RNA methylation, histone modifications and the organization of chromatin conformations, there is increasing interest in mechanisms involving post-transcriptional regulation of genome expression. Epigenetic regulation includes a series of events involving non-coding RNA transcripts [29]. These can be long non-coding RNAs (ncRNA) that contribute to chromatin states, or short ncRNA associated with enhancer activities, or microRNA (miRNA) that target specific transcripts to drive RNA interference (RNAi) regulation. ncRNA can impact gene silencing, genome maintenance, and genomic imprinting. miRNA can typically target several genes, inhibiting RNA stability or protein translation. miRNA themselves can be regulated at the level of transcription or at the level of transcript processing by Dicer proteins.

We hypothesize that epigenetic mechanisms may play a central role in the dynamic of host–parasite interactions. For example, lysine methylation of histone proteins could be a pivotal dynamic event in pathogen infections and provide new insights into the dynamic PTMs that contribute to infectious diseases. It is attractive to speculate how parasites can orchestrate stable and sustainable changes in host genome function, in the absence of changes in DNA sequence. Furthermore, the metabolic changes underlying parasitic

relationships could provide a framework for thinking about the link between infection, epigenetic modifications, and gene expression programs.

Hijacking the host epigenetic machinery and manipulating host gene expression

One can envisage many potential strategies that intracellular parasites might have evolved to manipulate host cell signaling pathways and impact host gene expression profiles upon infection [10, 17]. Intriguingly, there are several insightful examples where parasites target lysine methylation as a dynamic event in host-epigenome regulation. In a previous review, we proposed that parasite infections could be explored in terms of parasite “epigenators” that induce signal pathways within the host cells, nuclear “initiators” that integrate pathogen-induced signals at precise chromatin locations and/or DNA environments for the establishment of the epigenetic pathway, and, finally, “maintainer” to sustain the chromatin environment and transcriptional program through regulatory feedback loops [12]. Here, we revisit some of this conceptual framework, adding recent examples from the literature. Several groups have identified specific pathogen-encoded secreted effectors, which are secreted into the host cytoplasm or nucleus impacting host gene expression and metabolism. This work parallels the examples of bacterial “nucleomodulins” that have been described as strategies by which bacteria subvert host nuclear processes during infections [30, 31]. Here, we have chosen several examples that highlight the different strategies that intracellular parasites have evolved.

Strategy 1: induction of a host epigenetic enzyme

The case of *Theileria* and the SMYD3 methyltransferase (targeting H3K4 methylation)

One strategy that parasites employ to impact host gene expression and the host epigenome could be to induce the expression of host epigenetic enzymes. This could lead to a general deregulation of gene expression that might benefit the parasite's relationship with the host cell. A documented example of this was discovered in the parasite-induced transformation by *T. annulata*. One of the features of the transformation induced by *Theileria* spp. is an invasive phenotype, similar to that observed in metastatic tumors [6]. It was known for many years that this invasive phenotype was associated with overexpression of the gene encoding Matrix Metalloprotease-9 (*Mmp9*) which has a key role in tumor metastasis and angiogenesis [32]. We reported that induction of the host *Mmp9* gene involved direct induction of Histone H3 Lysine K4 (H3K4) trimethylation on the *Mmp9* promoter in parasite-transformed bovine lymphocytes [33]. The methylation of residue H3K4 is an epigenetic modification typically associated with active promoters. Analysis of a panel of mammalian H3K4 methyltransferases revealed that *Theileria* infection led to elevated levels of the gene encoding the *SMYD3* (SET and MYND-domain) methyltransferase. *SMYD3* binds to DNA recognition motifs in the *Mmp9* promoter, leading to methylation of H3K4 and induction of *Mmp9* expression. Thus, parasite infection was associated with transcriptional upregulation of the *SMYD3* enzyme which is deregulated in many human cancers and contributes to metastasis. This was the first example of epigenetic deregulation of host genes by *Theileria*. It is likely that parasite induction of *SMYD3* could regulate additional genes and perhaps modify non-histone substrates (e.g., MAPK signaling). This represents one example of how parasite infection can induce the expression of a host enzyme (in this case the lysine H3K4 methyltransferase *SMYD3*) to impact the host epigenome and regulate a gene that is critical to the invasive cancer phenotype (see figure (Fig. 3a)). It is currently unclear how the parasite induces *SMYD3* expression and whether this is directly via a secreted parasite effector protein or indirectly through host signaling pathways [33].

Strategy 2: secreting effector proteins that drive epigenetic repression of host genes

The case of *Toxoplasma* TEEGR and the EZH2 methyltransferase (targeting H3K27 methylation)

Intracellular *Toxoplasma gondii* secretes a number of parasite proteins into the host cell that interact with host transcription factors and regulate gene expression [10]. For example, the GRA16 dense granule protein interacts with host nuclear

proteins such as HAUSP (Herpes virus Associated Ubiquitin Specific Protease) and protein phosphatase PP2A, which may regulate host cell survival [34]. An elegant recent study identified another secreted, dense-granule effector, called TEEGR (*Toxoplasma* E2F4-associated EZH2-inducing Gene Regulator), that induces the expression of epigenetic regulators [35]. Once TEEGR is secreted into the host cell, it forms a complex in the host nucleus by associating with the E2F3 and E2F4 transcription factors. This complex drives expression of the host gene encoding the epigenetic enzyme EZH2, the catalytic subunit of the polycomb complex PRC2 that trimethylates H3K27 leading to transcriptional silencing [36]. The H3K27me3 epigenetic modification is classically associated with gene repression and heterochromatinized loci. The TEEGR-EZH2 pathway leads to a non-permissive chromatin state through H3K27 methylation on the promoters of NFκB target genes. Around 71 genes are repressed by TEEGR through EZH2, including a subset of NFκB-regulated cytokines (e.g., IL-1β and IL-6) and chemokines (e.g., IL-8 and CCL20), thereby allowing immune evasion and parasite persistence [35]. This is an interesting example of a parasite defense mechanism to counteract NFκB signaling pathways and cytokine production (see (Fig. 3b)). It also beautifully illustrates the potential of parasite-encoded proteins that have evolved sophisticated strategies to hijack the host epigenome.

Strategy 3: secreted effectors that target host chromatin regulatory complexes

The case of *Toxoplasma* effector TgIST and the chromatin-modifying repressor Mi-2 nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complex (targeting STAT1 transcription)

Upon infection, intracellular parasites must do their best to evade the nature defense of the innate immune system [5]. One strategy used by pathogens to reprogram host gene expression to their advantage is by targeting host chromatin or chromatin regulatory factors. Often, these chromatin regulators are large multi-protein complexes with histone-modifying and nucleosome remodeling components. One interesting example from bacteria is the nucleomodulin LntA, a virulence protein in *Listeria monocytogenes* [30]. LntA targets a heterochromatin factor BAHD1 that is a component of a large chromatin-silencing complex containing heterochromatin protein 1 (HP1), methyl-binding protein MBD1, histone deacetylases HDAC1 and HDAC2, and the KRAB-associated protein KAP1/TRIM28 [37]. The consequences are the induction of interferon-stimulated genes (ISG) [38]. Interestingly, ISG are also targeted by parasite effectors, but in a very different way. Parasite infection of cells by *T.gondii* blocks gamma-IFN-gamma dependent gene transcription. Two elegant studies by Gay et al. [39] and Olias et al. [40]

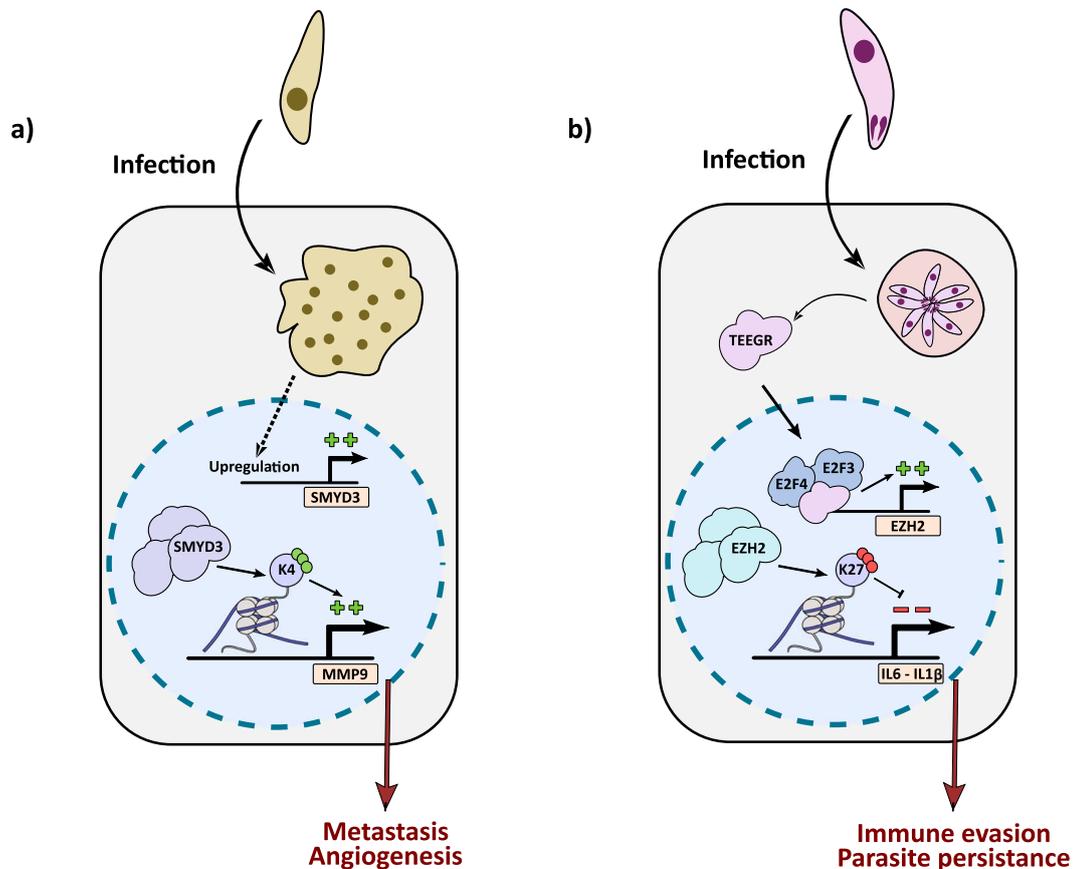


Fig. 3 Parasite effectors regulate host transcription. Secretion of numerous parasite effector proteins are key processes during parasite infection. Parasite effectors deregulate host expression profile which lead to host cell transformation, or escape from the host immune system to allow parasite persistence and survival. **a** Strategy 1: induction of a host epigenetic enzyme. Parasite infection leads to upregulation of SMYD3, a methyltransferase that activates genes involved in host transformation, through H3K4 trimethylation. **b** Strategy 2: secreting effector proteins that drive epigenetic repression of host genes. TEEGR activates a host chromatin modifier able to repress transcription of immune system genes through H3K27 trimethylation. **c** Strategy 3: secreted effectors that target host chromatin regulatory complexes. TgIST sequesters STAT1

showed that this is partly achieved by the *Toxoplasma* effector protein TgIST (*T. gondii* inhibitor of STAT transcription). TgIST enters the host nucleus through secretory granules and translocation across the PV membrane [40]. This effector can sequester STAT1 on dedicated loci and recruits the Mi-2 nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complex to create a repressive chromatin state and blocks the transcription of specific host genes through the STAT1 transcription factor [39–41]. The NuRD complex contains HDAC1 and HDAC2, chromatin remodeler CHD3 and CHD4, and transcriptional corepressors CtBP1 and CtBP2 [42]. In this way, the parasite blunts host immune defense by the inhibition of STAT1 dependent pro-inflammatory genes. Experiments demonstrate that the loss of TgIST causes reduced virulence and survival

transcription factor and interacts with NuRD complex, leading to a repressed chromatin state. **d** Strategy 4: parasite effectors that regulate signaling by molecular mimicry. TaPin1 degrades FBW7 stabilizing c-Jun in the process, and leading to an upregulation of oncogenic genes. **e** Strategy 5: secreting parasite transcripts that target host epigenetic enzymes. *Cdg7* is released by the parasite and interacts with PRDM1/G9a into the host nucleus, leading to repression of host immunity genes through H3K9 trimethylation. **f** Strategy 6: inducing host microRNAs that target host regulatory pathways. miR-126 releases JNK1, leading to phosphorylation of c-Jun and activation of genes involved in host transformation.

of *Toxoplasma* in host cells. This illustrative example shows how a parasite effector can recruit a host chromatin modifier complex for its own advantage, protecting the parasite from inflammation-associated host gene expression program [see (Fig. 3c)].

Strategy 4: parasite effectors that regulate signaling by molecular mimicry

The case of *Toxoplasma* effector GRA24 as a molecular scaffold (activating MAPK signaling)

Another plausible scenario is the secretion of pathogen proteins that can activate host signaling pathways by

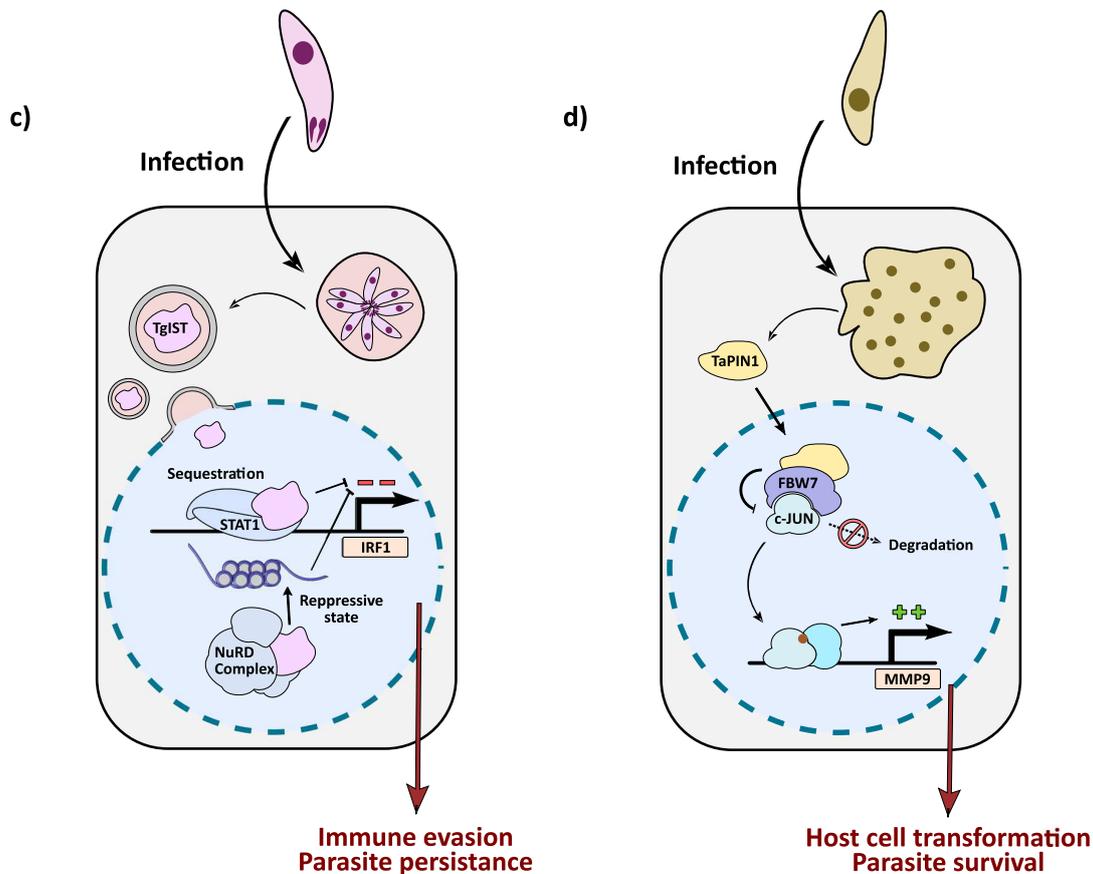


Fig. 3 (continued)

somehow mimicking (or replacing) host proteins important for pathway regulation. This may rely on protein domains (or catalytic activities) that interact with host proteins and bypass normal host regulatory mechanisms. One example of this strategy could be the *T. gondii* dense granule protein GRA24 [43]. This is an intriguing example to explain how GRA24 induces a pro-inflammatory cytokine response. Kinase-interacting motifs (KIMs) in the GRA24 protein can bind the p38alpha MAPK protein, and act as a scaffold to activate the kinase and translocate to the nucleus [44]. This induced MAPK signaling leads to activation of host transcription factors CREB and c-Fos and cytokine transcription.

The case of *Theileria* Pin1 prolyl isomerization (activating AP-1 and HIF1 transcription factors)

The transformation of host leukocytes by *Theileria* infection is associated with induction (and stabilization) of several host transcription factors with known oncogenic actions [45]. These include the oncogene Myc, the AP-1 transcription factor components c-Jun and s-Fos, and the hypoxia-induced factors 1alpha (HIF1a). But, the

mechanisms for inducing these nuclear proteins were unknown. We identified a secreted parasite effector protein that is a homolog of the host prolyl isomerase enzyme Pin1 [46]. The parasite TaPin1 protein activates the host c-Jun protein by inhibiting the activity of a ubiquitin ligase Fbw7 that normally leads to c-Jun degradation. We also showed that TaPin1 can interact with host Pyruvate Kinase PKM2 which leads to stabilization of the HIF1a protein [47]. The activation of c-Jun and HIF1a leads to the transcription upregulation of proliferative genes (e.g., cyclin D1) and metabolic enzymes (Glut1, Hexokinase 2), respectively. Interestingly, TaPin1 is the target of the anti-theilerial drug Buparvaquone [46].

These two examples show how parasite proteins can mimic host cell regulatory pathways by replacing host cell proteins to hijack signaling pathways [see (Fig. 3d)]. In bacteria, there are several reported cases of bacterial effectors that directly modify host epigenetic events by mimicking host enzymes. For example, the pathogen *Shigella flexneri* secretes the OspF which leads to dephosphorylation of histone H3S10 by hijacking nuclear host MAPK enzymes. Even more intriguing is the report of bacterial effectors that can directly methylate host

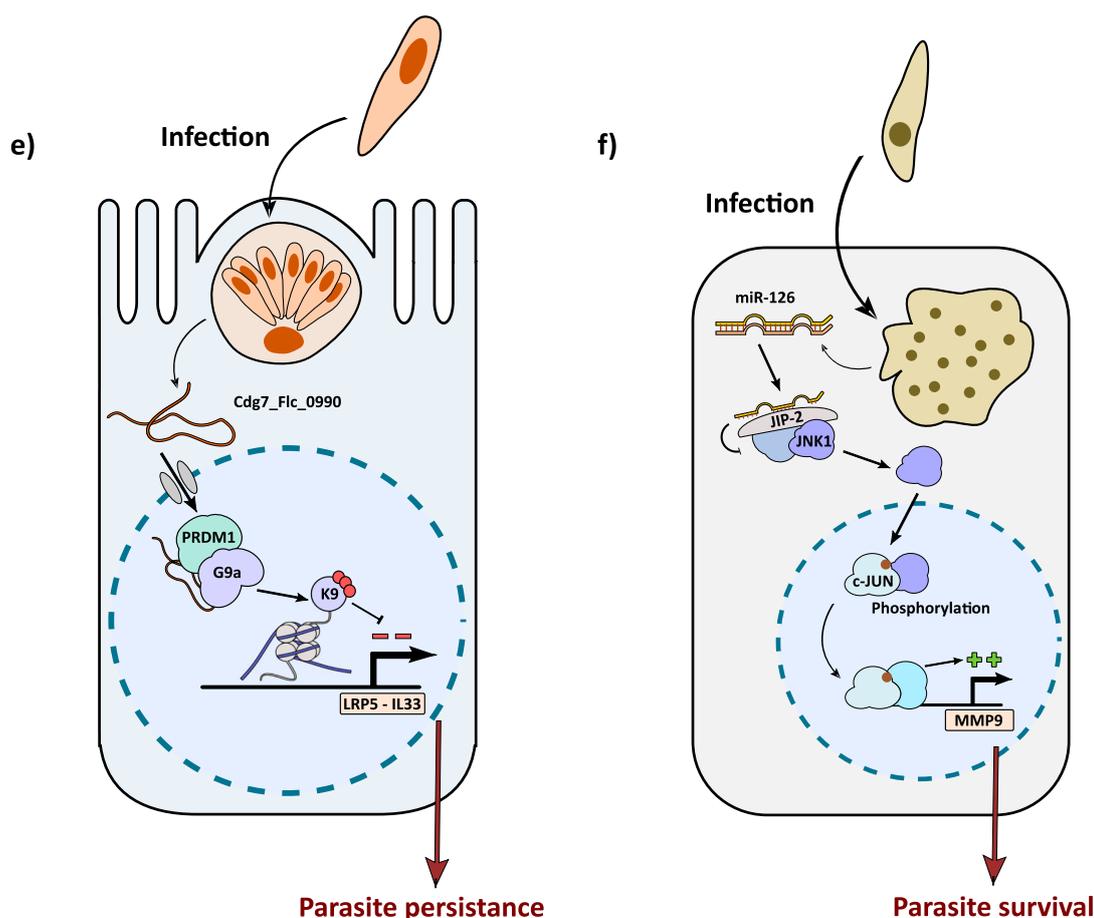


Fig. 3 (continued)

histones [48, 49]. The *Legionella pneumophila* RomA protein is secreted, and methylates H3K14 in the host nucleus [50], and the *C. trachomatis* nuclear effect E (NUE) is a secreted methyltransferase that binds to host chromatin in infected cells [51]. So far, no examples of direct nuclear epigenetic mimics have been reported in apicomplexa parasites.

Strategy 5: secreting parasite transcripts that target host epigenetic enzymes

The case of *Cryptosporidium* and the PRDM1-G9a methylation complex (targeting H3K9 methylation)

The parasite-secreted effectors need not be restricted to annotated proteins, but could potentially involve ncRNA mechanisms. The *Cryptosporidium* parasite has developed a particularly intriguing strategy to manipulate the action of host methyltransferases. Following infection, *C. parvum* secretes parasite, non-coding RNA transcripts into the host intestinal epithelial cells, and some of these transcripts can modulate host gene expression. For

example, the parasite Cdg7_Flc_0990 transcripts are recruited at the promoter region of certain host genes (e.g., *LRP5*, *SLC7A8*, and *IL33*), leading to their trans-suppression [52, 53]. Indeed, the parasite ncRNA seems to go on promoter regions together with G9a [54]. G9a is a histone methyltransferase known to methylate the histone mark H3K9 [55]. H3K9 methylation is associated with repressive chromatin and silenced transcription of the targeted genes. The parasite ncRNA appears to bind to G9a thanks to a G9a-interacting protein, PRDM1. Without PRDM1, there is a decrease of G9a occupancy at gene promoter and consequently a decrease of the repressive mark H3K9me3. By secreting a ncRNA transcript, *Cryptosporidium* is able to modify host gene expression in an ingenious way (see [Fig. 3e]). Other molecular mechanisms of gene repression during cryptosporidial infection have not yet been completely documented. Recent studies show the presence of many ncRNA genes in Apicomplexa parasites, around 118 transcripts for *Cryptosporidium* and 164 in *P. falciparum*, but it is unknown whether these impact the host epigenome.

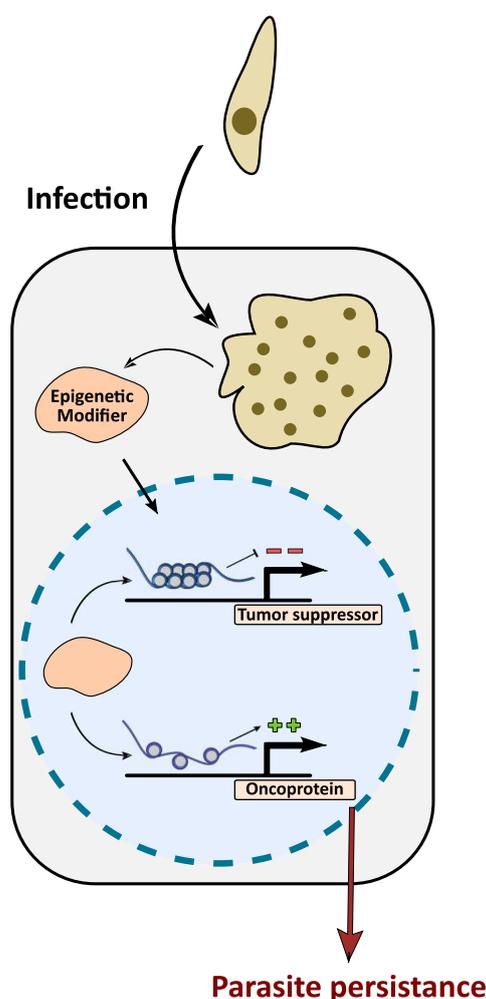


Fig. 4 The parasite could directly sequester epigenetic modifier that regulates host transcription. This is one of the many mechanisms that might exist in this intriguing host–parasite interaction.

Strategy 6: inducing host microRNAs that target host regulatory pathways

The case of the oncogenic microRNAs *miR-155* by *Theileria* parasites

Since the discover of microRNAs (miRNA) that can affect the expression and translation of a broad range of targets, it has emerged that microRNAs could offer an attractive strategy for perturbing host cell functions during parasitic infections [56]. We recently identified the oncomiR *miR-155* as a potentially epigenetic “maintainer” in a positive feedback loop through the regulation of the oncogenic c-Jun transcription factor [57]. The *miR-155* is transcriptionally upregulated in infected cells, and it targets the protein DET-1 leading to stabilization of the c-Jun protein that then binds to the promoter of the gene transcribing the *miR-155* transcript. This regulatory loop allows an epigenetic maintenance of the transformation by the

parasite. Another case of a parasite-regulated miRNA is the *miR-126-5p* microRNA which is also induced during *Theileria* infection. In this case, the microRNA targets the scaffold protein JIP-2, thereby liberating the signaling kinase JNK-1 [58]. JNK activation leads to phosphorylation and activation of the nuclear c-Jun transcription factor which is itself necessary for the expression of the metastasis-related gene *Mmp9*. These parasite-induced oncomiR are linked to tumorigenesis and inflammation and have also been reported in infections by other apicomplexan pathogens like *Toxoplasma* and *Cryptosporidium*. Indeed, the *miR-17-92* is overexpressed in cells infected with *T. gondii* and leads to resistance to apoptosis by acting on pro-apoptotic targets [59]. Similarly, the *miR155* and *miR146a* microRNAs are also overexpressed upon *Toxoplasma* infection and were reported to help maintain beneficial pathways for parasite survival at the expense of the host [60]. Thus, induction of host microRNAs to target host transcriptional regulators seems to be a common strategy employed by apicomplexan parasites (see [Fig. 3f]).

Concluding remarks

We have outlined six strategies developed by apicomplexan parasites to manipulate the host epigenome and reprogram host gene expression during infection. We have cited examples from the literature to demonstrate how these scenarios are employed. This is far from an exhaustive catalog, rather these case studies serve to illustrate the complexity of the strategies that have already been reported. We predict that the future year will continue to shed light on the importance of epigenetic regulation in host–parasite interactions [12, 17]. We have particularly highlighted examples of lysine methylation, as this is a particularly dynamic epigenetic modification and is used in a versatile number of ways to elicit both positive and negative effects on gene expression [61]. We note that there are several strategies for which no clear examples yet exist in the literature. For example, we have seen no cases implicating lysine demethylases in host–parasite interaction; though, we predict that these should also exist and would merit further exploration. Since small-molecule inhibitors exist to block both KMT and KDM activities, we wonder whether these drugs that have been mostly developed to treat cancer patients, could be repositioned for infectious diseases [62]. Finding drugs that target these proteins could prevent epigenetic modifications that underlie virulence and parasite survival [63]. The rapid progress in techniques to map epigenomic changes offers promise for a more comprehensive study of the role for epigenetic modifications in host–parasite interactions, and we would expect to see many studies linking parasite infection, to genome-wide epigenome modifications to transcriptome programs. We found little published evidence about the

impact of parasite infection on host DNA methylation. The availability of high-resolution technologies for DNA methylome analysis suggest that it is just a matter of time until these studies appear. Perhaps, the most exciting findings in recent years is the identification of a number of “epigenators” in apicomplexa parasites, and we expect there are many more to be discovered. The parallels in strategies developed by intracellular bacteria, and their “nucleomodulins” is particularly interesting and should give clues about where to look in the future. For the moment, there are no examples of parasite-secreted proteins that act directly as epigenetic enzymes in the host nucleus [Fig. 4]. Interestingly, *Theileria* parasite secretes several proteins with AT hook domains that translocate to the host nucleus. For example, SuAT1 affect cell morphology and transcription in bovine macrophages [64]. Unfortunately, we know relatively little about the role of these AT hook proteins in reprogramming the host transcriptome or how they interact with the host epigenome. We predict that parasite-encoded effectors are likely to provide much exciting science in the years to come and anticipate fascinating insights into their contribution to the dynamics of host–parasite interactions. We might also speculate on future studies looking more closely at the parasite epigenomes and how host cellular states (or even host protein effectors) impact gene regulation in intracellular parasites. Finally, we note that metabolism is a key element of parasitism. It will be interesting to explore the role of host and parasite metabolic pathways and activity in host–parasite interactions and the extent to which intermediates of metabolism (particularly the methyl donor SAM, and the acetyl donor Acetyl-CoA participate in this two-way relationship [65]. We hope this brief review, has whet the reader’s appetite for the exciting years ahead.

Acknowledgments JBW is a senior member of the Institut Universitaire de France (IUF). We thanks members of the Weitzman lab and members of the UMR7216 for helpful discussions.

Funding information The work in our lab is supported by the LabEx “Who Am I?” #ANR-11-LABX-0071, and the Université de Paris IdEx #ANR-18-IDEX-0001 funded by the French Government through its “Investments for the Future” program, the Agence Nationale de la Recherche (ANR PATHO-METHYLOME #ANR-15-CE12-0020), and the Plan Cancer “Epigénétique et cancer” 2015 (PARA-CAN #PARA-15-RCA).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Seeber F, Steinfeld S (2016) Recent advances in understanding apicomplexan parasites. *F1000Res* 5:1369
2. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K (2016) Malaria: biology and disease. *Cell*. 167(3):610–624
3. Pasternak ND, Dzikowski R (2009) PfEMP1: an antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Int J Biochem Cell Biol* 41(7): 1463–1466
4. Hviid L, Jensen ATR (2015) PfEMP1 – a parasite protein family of key importance in *Plasmodium falciparum* malaria immunity and pathogenesis. *Adv Parasitol* 88:51–84
5. Hunter CA, Sibley LD (2012) Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol* 10(11): 766–778
6. Tretina K, Gotia HT, Mann DJ, Silva JC (2015) *Theileria*-transformed bovine leukocytes have cancer hallmarks. *Trends Parasitol* 31(7):306–314
7. Dobbelaere DA, Küenzi P (2004) The strategies of the *Theileria* parasite: a new twist in host–pathogen interactions. *Curr Opin Immunol* 16(4):524–530
8. Morisaki JH, Heuser JE, Sibley LD (1995) Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Sci* 108(Pt 6):2457–2464
9. Hakimi M-A, Bougdour A (2015) *Toxoplasma*’s ways of manipulating the host transcriptome via secreted effectors. *Curr Opin Microbiol* 26:24–31
10. Hakimi M-A, Olias P, Sibley LD (2017) *Toxoplasma* effectors targeting host signaling and transcription. *Clin Microbiol Rev* 30(3):615–645
11. Soldati D, Dubremetz JF, Lebrun M (2001) Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 31(12):1293–1302
12. Cheeseman K, Weitzman JB (2015) Host-parasite interactions: an intimate epigenetic relationship. *Cell Microbiol* 17(8):1121–1132
13. Heussler VT, Rottenberg S, Schwab R, Küenzi P, Fernandez PC, McKellar S, Shiels B, Chen ZJ, Orth K, Wallach D, Dobbelaere DA (2002) Hijacking of host cell IKK signalosomes by the transforming parasite *Theileria*. *Science*. 298(5595):1033–1036
14. Certad G, Viscogliosi E, Chabé M, Cacciò SM (2017) Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends Parasitol* 33(7):561–576
15. Clough B, Frickel E-M (2017) The *Toxoplasma* parasitophorous vacuole: an evolving host–parasite frontier. *Trends Parasitol* 33(6):473–488
16. Robert McMaster W, Morrison CJ, Kobor MS (2016) Epigenetics: a new model for intracellular parasite–host cell regulation. *Trends Parasitol* 32(7):515–521
17. Silmon de Monerri NC, Kim K (2014) Pathogens hijack the epigenome. *Am J Pathol* 184(4):897–911
18. Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*. 128(4):693–705
19. Deaton AM, Bird A (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25(10):1010–1022
20. Huang H, Weng H, Chen J (2019) The biogenesis and precise control of RNA m6A methylation. *Trends Genet* 36(1):44–52
21. Baumgarten S, Bryant JM, Sinha A, Reyser T, Preiser PR, Dedon PC, Scherf A (2019) Transcriptome-wide dynamics of extensive m6A mRNA methylation during *Plasmodium falciparum* blood-stage development. *Nat Microbiol* 4(12):2246–2259
22. Hattman S (2005) DNA-[adenine] methylation in lower eukaryotes. *Biochem*. 70(5):550–558
23. Tessarz P, Kouzarides T (2014) Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(11):703–708
24. Sindikubwabo F, Ding S, Hussain T, Ortet P, Barakat M et al (2017) Modifications at K31 on the lateral surface of histone H4 contribute to genome structure and expression in apicomplexan parasites. *Elife*. 6. pii: e29391

25. Bannister AJ, Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21(3):381–395
26. Carlson SM, Gozani O (2016) Nonhistone lysine methylation in the regulation of cancer pathways. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6(11):a026435
27. Dillon SC, Zhang X, Trievel RC, Cheng X (2005) The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol* 6(8):227
28. Wu Z, Connolly J, Biggar KK (2017) Beyond histones - the expanding roles of protein lysine methylation. *FEBS J* 284(17):2732–2744
29. Wei J-W, Huang K, Yang C, Kang C-S (2017) Non-coding RNAs as regulators in epigenetics. *Oncol Rep* 37(1):3–9
30. Biernie H, Cossart P (2012) When bacteria target the nucleus: the emerging family of nucleomodulins. *Cell Microbiol* 14(5):622–633
31. Weitzman MD, Weitzman JB (2014) What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity. *Cell Host Microbe* 15(3):283–294
32. Somerville RPTT, Adamson RE, Brown CGDD, Hall FR (1998) Metastasis of *Theileria annulata* macrophage-infected cells in scid mice is mediated by matrix metalloproteinases. *Parasitology* 116(3):S0031182097002151
33. Cock-Rada AM, Medjkane S, Janski N, Youfi N, Perichon M, Chaussepied M, Chluba J, Langsley G, Weitzman JB (2012) SMYD3 promotes cancer invasion by epigenetic upregulation of the metalloproteinase MMP-9. *Cancer Res* 72(3):810–820
34. Bougdour A, Durandau E, Brenier-Pinchart MP, Ortel P, Barakat M, Kieffer S, Curt-Varesano A, Curt-Bertini RL, Bastien O, Coute Y, Pelloux H, Hakimi MA (2013) Host cell subversion by *Toxoplasma* GRA16, an exported dense granule protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression. *Cell Host Microbe* 13(4):489–500
35. Braun L, Brenier-Pinchart M-P, Hammoudi P-M, Cannella D, Kieffer-Jaquinod S et al (2019) The *Toxoplasma* effector TEEGR promotes parasite persistence by modulating NF- κ B signalling via EZH2. *Nat Microbiol* 4(7):1208–1220
36. Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D (2002) Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the enhancer of Zeste protein. *Genes Dev* 16(22):2893–2905
37. Biernie H, Tham TN, Batsche E, Dumay A, Leguillou M, Kernéis-Golsteyn S, Regnault B, Seeler JS, Muchardt C, Feunteun J, Cossart P (2009) Human BAHDI promotes heterochromatic gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(33):13826–13831
38. Lebreton A, Lakisic G, Job V, Fritsch L, Tham TN et al (2011) A bacterial protein targets the BAHDI chromatin complex to stimulate type III interferon response. *Science* 331(6022):1319–1321
39. Gay G, Braun L, Brenier-Pinchart M-P, Vollaire J, Josserand V et al (2016) *Toxoplasma gondii* TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN- γ -mediated host defenses. *J Exp Med* 213(9):1779–1798
40. Olias P, Etheridge RD, Zhang Y, Holtzman MJ, Sibley LD (2016) *Toxoplasma* effector recruits the Mi-2/NuRD complex to repress STAT1 transcription and block IFN- γ -dependent gene expression. *Cell Host Microbe* 20(1):72–82
41. Denslow SA, Wade PA (2007) The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene* 26(37):5433–5438
42. Tong JK, Hassig CA, Schnitzler GR, Kingston RE, Schreiber SL (1998) Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. *Nature* 395(6705):917–921
43. Braun L, Brenier-Pinchart MP, Yogavel M, Curt-Varesano A, Curt-Bertini RL, Hussain T, Kieffer-Jaquinod S, Coute Y, Pelloux H, Tardieux I, Sharma A, Belrhali H, Bougdour A, Hakimi MA (2013) A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by STAT3-miR-17-92-Bim pathway in macrophages. *Cell Signal* 26(6):1204–1212
44. Cannella D, Brenier-Pinchart MP, Braun L, vanRooyen JM, Bougdour A et al (2014) MiR-146a and miR-155 delineate a microRNA fingerprint associated with *toxoplasma* persistence in the host brain. *Cell Rep* 6(5):928–937
45. Husmann D, Gozani O (2019) Histone lysine methyltransferases in biology and disease. *Nat Struct Mol Biol* 26(10):880–889
46. Morera L, Lübbert M, Jung M (2016) Targeting histone methyltransferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy. *Clin Epigenetics* 8(1):57
47. Copeland RA (2018) Protein methyltransferase inhibitors as precision cancer therapeutics: a decade of discovery. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* 373(1748). pii: 20170080
48. promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation. *J Exp Med* 210(10):2071–2086
49. Pellegrini E, Palencia A, Braun L, Kapp U, Bougdour A, Belrhali H, Bowler MW, Hakimi MA (2017) Structural basis for the subversion of MAP kinase signaling by an intrinsically disordered parasite secreted agonist. *Structure* 25(1):16–26
50. Dessauge F, Lizundia R, Baumgartner M, Chaussepied M, Langsley G (2005) Taking the Myc is bad for *Theileria*. *Trends Parasitol* 21(8):377–385
51. Marsolier J, Perichon M, DeBarry JD, Villoutreix BO, Chluba J, Lopez T, Garrido C, Zhou XZ, Lu KP, Fritsch L, Ait-Si-Ali S, Mhadhbi M, Medjkane S, Weitzman JB (2015) *Theileria* parasites secrete a prolyl isomerase to maintain host leukocyte transmigration. *Nature* 520(7547):378–382
52. Marsolier J, Perichon M, Weitzman JB, Medjkane S (2019) Secreted parasite Pin1 isomerase stabilizes host PKM2 to reprogram host cell metabolism. *Commun Biol* 2(1):152
53. Zurawski DV, Mumy KL, Faherty CS, McCormick BA, Maurelli AT (2009) *Shigella flexneri* type III secretion system effectors OspB and OspF target the nucleus to downregulate the host inflammatory response via interactions with retinoblastoma protein. *Mol Microbiol* 71(2):350–368
54. Biernie H, Hamon M, Cossart P (2012) Epigenetics and bacterial infections. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(12):a010272–a010272
55. Rolando M, Sanulli S, Rusniok C, Gomez-Valero L, Bertholet C, Sahr T, Margueron R, Buchrieser C (2013) *Legionella pneumophila* effector RomA uniquely modifies host chromatin to repress gene expression and promote intracellular bacterial replication. *Cell Host Microbe* 13(4):395–405
56. Pennini ME, Perrinet S, Dautry-Varsat A, Subtil A (2010) Histone methylation by NUE, a novel nuclear effector of the intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis*. *PLoS Pathog* 6(7):1–12
57. Ming Z, Gong A-Y, Wang Y, Zhang X-T, Li M et al (2018) Involvement of *Cryptosporidium parvum* Cdg7_FLc_1000 RNA in the attenuation of intestinal epithelial cell migration via trans-suppression of host cell SMPD3. *J Infect Dis* 217(1):122–133
58. Ming Z, Gong AY, Wang Y, Zhang XT, Li M, Li Y, Pang J, Dong S, Strauss-Soukup JK, Chen XM (2018) Trans-suppression of host CDH3 and LOXL4 genes during *Cryptosporidium parvum* infection involves nuclear delivery of parasite Cdg7_FLc_1000 RNA. *Int J Parasitol* 48(6):423–431
59. Wang Y, Gong A-Y, Ma S, Chen X, Strauss-Soukup JK, Chen X-M (2017) Delivery of parasite Cdg7_Flc_0990 RNA transcript into intestinal epithelial cells during *Cryptosporidium parvum* infection suppresses host cell gene transcription through epigenetic mechanisms. *Cell Microbiol* 19(11):e12760
60. Tachibana M, Sugimoto K, Fukushima T, Shinkai Y (2001) SET domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to Lysines 9 and 27 of Histone H3. *J Biol Chem* 276(27):25309–25317
61. Menard KL, Haskins BE, Denkers EY (2019) Impact of *Toxoplasma gondii* infection on host non-coding RNA responses. *Front Cell Infect Microbiol* 9:132
62. Marsolier J, Pineau S, Medjkane S, Perichon M, Yin Q, Flemington E, Weitzman MD, Weitzman JB (2013) OncomiR addiction is generated by a miR-155 feedback loop in *Theileria*-transformed leukocytes. *PLoS Pathog* 9(4):e1003222
63. Haidar M, Rchiad Z, Ansari HR, Ben-Rached F, Tajeri S et al (2018) miR-126-5p by direct targeting of JNK-interacting protein-2 (JIP-2) plays a key role in *Theileria*-infected macrophage virulence. *PLoS Pathog* 14(3):e1006942
64. Cai Y, Chen H, Mo X, Tang Y, Xu X, Zhang A, Lun Z, Lu F, Wang Y, Shen J (2014) *Toxoplasma gondii* inhibits apoptosis via a novel
65. Shiels BR, McKellar S, Katzer F, Lyons K, Kinnaird J et al (2004) A *Theileria annulata* DNA binding protein localized to the host cell nucleus alters the phenotype of a bovine macrophage cell line. *Eukaryot Cell* 3(2):495–505
66. Xu T, Ping J, Yu Y, Yu F, Yu Y et al (2010) Revealing parasite influence in metabolic pathways in Apicomplexa infected patients. *BMC Bioinformatics*. 2010 Dec 14;11 Suppl 11:S13

ANNEXE 2 : Tableau des 146 candidats potentiels de MC2646 obtenus après une expérience de spectrométrie de masse (cf condition de l'expérience Résultats III-4)

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Area (p)	q Value	Max fold change	Power	Highest mean condition	Lowest mean condition	description
4	tr GSM95 GSM95_BOVIN	4	171.04	3.95E-07	0.000248034	7.35667806	1	4564	2646	Uncharacterized protein OS=tBos taurus OX=9913 GN=FC2 SV=2
5	GSM95 VTDB_BOVIN tr AA03QLQ02	1	62.49	7.70E-07	0.000248034	7.72306412	1	4564	2646	Uncharacterized protein OS=tBos taurus OX=9913 GN=FC2 SV=1
6	GSM95 AA1T_BOVIN	10	575.71	2.89E-06	0.000607373	10.93917739	1	4564	2646	Vitamin D-binding protein OS=tBos taurus OX=9913 GN=FC2 SV=1
7	Q32471 APOE_BOVIN tr AA014407881 f	7	374.79	5.48E-06	0.000688778	19.5648255	1	4564	2646	Alpha-1-antiprotease OS=tBos taurus OX=9913 GN=SERMINA1 PE=1 SV=1
8	Q05443 LUM_BOVIN	6	317.1	6.58E-06	0.000688778	13.6302412	1	4564	2646	Lumican OS=tBos taurus OX=9913 GN=LUM PE=1 SV=1
9	Q254H1 AZM6_BOVIN	29	1664.16	7.05E-06	0.000688778	9.966625133	1	4564	2646	Alpha-2-macroglobulin OS=tBos taurus OX=9913 GN=AZM6 PE=1 SV=2
10	tr F68P6 F68P6_BOVIN	8	8.763	8.52E-06	0.000671692	19.6545199	1	4564	2646	Serpin family D member 1 OS=tBos taurus OX=9913 GN=SERPIND1 PE=3 SV=1
11	tr P2763 FETU4_BOVIN	9	680.4	9.65E-06	0.000671692	9.277653086	1	4564	2646	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=tBos taurus OX=9913 GN=H6G PE=1 SV=2
12	P25497 APOA1_BOVIN	12	824.91	1.86E-05	0.00117614	20.2555257	1	4564	2646	Apolipoprotein A1 OS=tBos taurus OX=9913 GN=APOA1 PE=1 SV=3
13	Q20281 HBB_BOVIN	11	1097.23	2.52E-05	0.00135151	9.344135671	1	4564	2646	Hemoglobin beta subunit beta OS=tBos taurus OX=9913 GN=HBB PE=1 SV=1
14	tr P0107 ANGT_BOVIN	10	642.1	2.78E-05	0.00135151	41.5174837	1	4564	2646	Angiotensinogen OS=tBos taurus OX=9913 GN=ANGT PE=1 SV=2
15	Q0UYX4 G03_BOVIN	38	2209.16	3.90E-05	0.001755443	13.5900949	1	4564	2646	Complement C3 OS=tBos taurus OX=9913 GN=C3 PE=1 SV=2
16	P56652 ITIH3_BOVIN tr AA03QLQ021 f	9	384.68	4.86E-05	0.001995163	3.590953377	1	4564	2646	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 OS=tBos taurus OX=9913 GN=ITIH3 PE=1 SV=2
17	tr P8187 CFAB_BOVIN tr AA03QLQ95 f	8	590.95	5.06E-05	0.001995163	11.48580767	1	4564	2646	Complement factor B OS=tBos taurus OX=9913 GN=CFB PE=1 SV=2
18	tr Q22857 Q22857_BOVIN	9	630.53	6.10E-05	0.00223532	5.263908484	1	4564	2646	Vitreonectin OS=tBos taurus OX=9913 GN=VTN PE=1 SV=1
19	P28800 AZAP_BOVIN	1	48.23	8.05E-05	0.002820929	3.995095292	1	4564	2646	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=tBos taurus OX=9913 GN=ITIH2 PE=1 SV=1
20	tr Q08E32 Q08E32_BOVIN	56.31	56.31	0.000150786	0.004828034	3.663911661	1	4564	2646	CHMP1B protein OS=tBos taurus OX=9913 GN=CHMP1B PE=1 SV=2
21	tr P8164 APOA2_BOVIN	1	41.73	0.000153047	0.004828034	6.48059315	1	4564	2646	Apolipoprotein A-II OS=tBos taurus OX=9913 GN=APOA2 PE=1 SV=2
22	Q32C26 AN32B_BOVIN tr FAM246 F1M	3	122.54	0.000194625	0.005497133	2.294682584	1	4564	2646	Arctic luciferin nuclear phosphoprotein 32 family member B OS=tBos taurus OX=9913 GN=ANP32B PE=1 SV=1
23	tr AA03QLQ06 AA03QLQ06_BOVIN	1	39.19	0.000200396	0.005497133	9.45742777	1	4564	2646	Nuclear factor of activated T cells 2 OS=tBos taurus OX=9913 GN=NFACT2 PE=4 SV=1
24	Q28065 CABPA_BOVIN tr AA03QLQ9 f	2	76.82	0.000216576	0.005693435	12.11748244	1	4564	2646	Cdk-binding protein alpha chain OS=tBos taurus OX=9913 GN=CDBPA PE=1 SV=1
25	tr E186E3 E186E3_BOVIN	12	621.06	0.000279686	0.006786919	4.78597005	1	4564	2646	Importin γ OS=tBos taurus OX=9913 GN=IPG7 PE=4 SV=1
26	P17697 CLUS_BOVIN	7	335.53	0.000300897	0.007002076	5.87426679	1	4564	2646	Clusterin OS=tBos taurus OX=9913 GN=CLU PE=1 SV=1
27	tr AA03QLQ6 AA03QLQ6_BOVIN f	21	1405.94	0.000340566	0.00754298	4.288787828	1	4564	2646	KH-type splicing regulatory protein OS=tBos taurus OX=9913 GN=KHSPR PE=1 SV=1
28	tr AA03QLQ16 AA03QLQ16_BOVIN f	5	188.63	0.000353617	0.00754298	58.0502126	1	4564	2646	Uncharacterized protein OS=tBos taurus OX=9913 GN=UCP828 PE=3 SV=1
29	tr AA03QLQ49 AA03QLQ49_BOVIN f	5	219.57	0.000353617	0.00754298	21.06106865	1	4564	2646	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=tBos taurus OX=9913 GN=ITIH2 PE=1 SV=1
30	P00725 THRB_BOVIN tr AA0452066 A	1	68.63	0.000464694	0.009004478	48.34269973	1	4564	2646	Prothrombin OS=tBos taurus OX=9913 GN=PF2 PE=1 SV=2
31	Q2Z2H0 GPR75_BOVIN	19	1217.51	0.000470975	0.009004478	1.657055738	1	4564	2646	Stress-70 protein, mitochondrial OS=tBos taurus OX=9913 GN=HSPA9 PE=2 SV=1
32	Q31951 ITIH4_BOVIN tr AA03QLQ09 f	7	354.18	0.00092112	0.016143159	7.937921368	1	4564	2646	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=tBos taurus OX=9913 GN=ITIH4 PE=1 SV=1
33	tr AA03QLQ02 AA03QLQ02_BOVIN	1	36.76	0.000992808	0.016929285	3.542897916	1	4564	2646	Uncharacterized protein OS=tBos taurus OX=9913 PE=3 SV=1
34	P19053 APOC3_BOVIN	2	160.6	0.001056727	0.01714403	19.6311198	1	4564	2646	Apolipoprotein C-III OS=tBos taurus OX=9913 GN=APOC3 PE=1 SV=2
35	P0Z070 HBB_BOVIN	5	324.68	0.001116845	0.017616014	18.01246931	1	4564	2646	Hemoglobin subunit beta OS=tBos taurus OX=9913 GN=HBB PE=1 SV=1
36	A2V708 IMAS_BOVIN Q07VMO IMAT_1	2	96.04	0.001169736	0.018002067	2.247752479	1	4564	2646	Importin subunit alpha-5 OS=tBos taurus OX=9913 GN=IPMA1 PE=2 SV=1
37	tr A15A61 ADMT1_BOVIN	1	42.64	0.001236979	0.018581803	3.965519874	1	4564	2646	Proteasomal ubiquitin receptor ADM1 OS=tBos taurus OX=9913 GN=ADMT1 PE=2 SV=1
38	Q86611 PMD5_BOVIN	1	36.66	0.001437461	0.0208611912	3.10421827	1	4564	2646	Peroxiredoxin-5, mitochondrial OS=tBos taurus OX=9913 GN=PRDX5 PE=2 SV=2
39	tr F1M103 F1M103_BOVIN	15	26.9	0.001654927	0.02211471	3.308412499	1	4564	2646	Alpha-amylase OS=tBos taurus OX=9913 GN=AMYZ PE=3 SV=1
40	tr AA03QLQ69 AA03QLQ69_BOVIN	1	624.39	0.001661519	0.02211471	2.10665209	1	4564	2646	Axan-2 like OS=tBos taurus OX=9913 GN=AXAN2 PE=3 SV=1
41	Q86611 PMD2_BOVIN	4	156.71	0.001804271	0.02211471	6.24328234	1	4564	2646	Peroxiredoxin-2 OS=tBos taurus OX=9913 GN=PRDX2 PE=2 SV=1
42	Q276V1 RF3_BOVIN	6	316.25	0.001961533	0.02751689	1.463831596	1	4564	2646	Replication factor C subunit 3 OS=tBos taurus OX=9913 GN=RFC3 PE=2 SV=1
43	tr AA03QLQ135 AA03QLQ135_BOVIN	6	60	0.00244957	0.029144523	8.74448495	1	4564	2646	Uncharacterized protein OS=tBos taurus OX=9913 PE=3 SV=1
44	P01966 HBA_BOVIN	7	716.99	0.00254065	0.029144523	10.384999316	1	4564	2646	Hemoglobin subunit alpha OS=tBos taurus OX=9913 GN=HBA PE=1 SV=2
45	Q32C24 I4337_BOVIN tr AA03QLQ033	7	346.96	0.00316647	0.03880878	2.86972008	1	4564	2646	I4-33 protein theta A OS=tBos taurus OX=9913 GN=I4A3 PE=1 SV=1
46	P37305 PMD3_BOVIN	2	123.26	0.003242688	0.034097985	2.900352071	1	4564	2646	Theonin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=tBos taurus OX=9913 GN=PRDX3 PE=1 SV=1
47	Q0VCE3 YTHD2_BOVIN	1	50.4	0.003346484	0.034155653	3.04877886	1	4564	2646	YTH domain-containing family protein 2 OS=tBos taurus OX=9913 GN=YTHD2 PE=3 SV=1
48	P86657 PMD3_BOVIN tr ASD781 ASD7	12	736.54	0.003356444	0.034155653	2.20214659	1	4564	2646	Protein disulfide-isomerase A3 OS=tBos taurus OX=9913 GN=PDIA3 PE=2 SV=1
49	Q6R607 IF5A1_BOVIN	4	292.33	0.003519933	0.034696985	2.472442659	1	4564	2646	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 OS=tBos taurus OX=9913 GN=EIF5A PE=2 SV=3
50	tr AA03QLQ69 AA03QLQ69_BOVIN	1	55.1	0.0039860571	0.037242548	2.00766868	1	4564	2646	Myosin IIB OS=tBos taurus OX=9913 GN=MYO9B PE=3 SV=1
51	Q3TDD0 HNMRK_BOVIN	20	1586.9	0.004013964	0.037242548	1.83200506	1	4564	2646	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=tBos taurus OX=9913 GN=HNMRK PE=2 SV=1
52	Q35VU7 TNPO1_BOVIN tr AA03QLQ10	5	196.74	0.004379233	0.038601484	3.887095738	1	4564	2646	Transportin-1 OS=tBos taurus OX=9913 GN=TNPO1 PE=1 SV=2
53	Q5E9B7 CLIC1_BOVIN	4	204.86	0.004393668	0.038601484	3.159191388	1	4564	2646	Chloride intracellular channel protein 1 OS=tBos taurus OX=9913 GN=CLIC1 PE=2 SV=3

54	QOVCOI CPBP2_BOVIN F1N0531.F1N1	3	127.53	0.00453016	0.038997675	2.193560251	0.966605915	Comp	2646	C-terminal-binding protein 2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=CTBP2 PE=1 SV=1
55	AIIEI9Y EIBN9_BOVIN FAA52D14/	3	2.88213715	0.004693595	0.040670589	2.88213715	0.961407855	Comp	2646	Double-strand break repair protein OS=Bos taurus OX=9913 GN=MMRE11 PE=3 SV=2
56	FRH7Q IDBNL_BOVIN FAA52D14/	2	133.43	0.005612196	0.042460643	4.035113134	0.953178965	Comp	2646	Drefrin-like protein OS=Bos taurus OX=9913 GN=DNL PE=2 SV=1
57	QSE9A3 PBP1_BOVIN	8	586.95	0.005763939	0.044891255	2.45253748	0.951227248	Comp	2646	Poly(C)binding protein 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=PBP1 PE=2 SV=1
58	PP6623 CN37_BOVIN	1	73.05	0.005882294	0.04521142	2.193198294	0.94686742	Comp	2646	2',3'-cyclic-nucleotide 3-phosphodiesterase OS=Bos taurus OX=9913 GN=CNP PE=2 SV=2
59	TI AAM97 A7N987_BOVIN	7	272.08	0.006126699	0.04571142	2.193520383	0.946591987	Comp	2646	NFKB2 protein OS=Bos taurus OX=9913 GN=NFKB2 PE=3 SV=1
60	OR0780 THIO_BOVIN	3	173.89	0.00616271	0.04571142	4.660360407	0.946048515	Comp	2646	Thioredoxin OS=Bos taurus OX=9913 GN=TXN PE=3 SV=3
61	AIIEI81 SRR1_BOVIN	13	638.38	0.006597827	0.047320388	1.563147979	0.940378388	Comp	2646	Serrate RNA effector molecule homolog OS=Bos taurus OX=9913 GN=SRR1 PE=2 SV=1
62	QSZT3 A8H9_BOVIN FAA5QIMC9	4	188.08	0.00679567	0.047320388	1.805113181	0.93787811	Comp	2646	Protein ABHD11 OS=Bos taurus OX=9913 GN=ABHD11 PE=2 SV=1
63	TI EIB9H EIB9H_BOVIN	11	566.49	0.006825191	0.047320388	1.566722913	0.937433088	Comp	2646	Cell cycle and apoptosis regulator 2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=CAR2 PE=4 SV=1
64	TI AAQ3QIWE3 AAQ3QIWE3_BOVIN	2	60.38	0.007066061	0.047850048	3.451993245	0.934408655	Comp	2646	Calcium-transferrin ATPase OS=Bos taurus OX=9913 GN=ATP2A2 PE=1 SV=1
65	PT934 AAMK6_BOVIN FAA5QIM31	23	1107.45	0.007186097	0.047850048	1.500890386	0.93270941	Comp	2646	Amoebin A6 OS=Bos taurus OX=9913 GN=AAMK6 PE=1 SV=2
66	TI AQCQV8 AQCQV8_BOVIN	6	335.01	0.00789574	0.050832519	1.563147979	0.923420388	Comp	2646	3beta-hydroxysteroid Delta 14H-reductase OS=Bos taurus OX=9913 GN=HSD17B4 PE=2 SV=1
67	TI FERR01 FERR0_BOVIN	4	159.33	0.008244865	0.052522893	1.895524689	0.918983038	Comp	2646	Leucine rich repeat containing 8 VRAK subunit E OS=Bos taurus OX=9913 GN=LRR PE=2 SV=1
68	QSR062 FETUB_BOVIN	1	28.12	0.008372603	0.052522893	1.286141507	0.917430618	Comp	2646	Fetuin-B OS=Bos taurus OX=9913 GN=FETUB PE=3 SV=1
69	TI EIB170 EIB170_BOVIN	1	66.6	0.009453549	0.054562435	2.451066589	0.903807388	Comp	2646	Rho GTPase activating protein 45 OS=Bos taurus OX=9913 GN=ARRGA PE=1 SV=3
70	TI QSYV6 QSYV6_BOVIN	8	455.44	0.009599551	0.054562435	2.115901783	0.901744693	Comp	2646	Importin subunit alpha OS=Bos taurus OX=9913 GN=IPMA2 PE=1 SV=1
71	TI AAQ3QIM32 AAQ3QIM32_THEAN	3	160.7	0.010318272	0.055641133	2.164241744	0.892791447	Comp	2646	Undeclared protein OS=Thelliera annulata OX=5874 GN=FA1B PE=2 SV=1
72	PR8250 1433B_BOVIN FAA1407894/	3	331.21	0.011522894	0.058970449	2.013073687	0.878144238	Comp	2646	14-3-3 protein beta/alpha OS=Bos taurus OX=9913 GN=VHAB8 PE=1 SV=2
73	TI ASD977 ASD977_BOVIN QZCQ2	1	35.19	0.011728885	0.058970449	5.927894551	0.875833079	Comp	2646	Small monomeric GTPase OS=Bos taurus OX=9913 GN=SMMD2 PE=1 SV=2
74	TI AAQ3QIMQ7 AAQ3QIMQ7_BOVIN	3	162.26	0.011889846	0.058970449	1.541056679	0.874133724	Comp	2646	EMS RNA binding protein 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=EMSR1 PE=3 SV=1
75	PS6701 PSMID2_BOVIN FAA5QIM4	4	190.01	0.012113151	0.059231287	1.966909151	0.871133342	Comp	2646	Z55 proteasome non-T4 subunit OS=Bos taurus OX=9913 GN=MBD2 PE=4 SV=2
76	TI GSE683 GSE683_BOVIN	2	113.31	0.012484169	0.059231287	1.267948065	0.867666449	Comp	2646	Methyl-CpG binding domain protein 2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=MBD2 PE=4 SV=2
77	TI QOVCK QOVCK_BOVIN	2	189.02	0.01266811	0.059231287	1.84667297	0.864663448	Comp	2646	Myeloid-associated differentiation marker OS=Bos taurus OX=9913 GN=MYADM2 PE=2 SV=1
78	TI FAMH6 FAMH6_BOVIN	3	111.87	0.012740115	0.059231287	4.527056796	0.86331287	Comp	2646	REL proto-oncogene, NF-kB subunit OS=Bos taurus OX=9913 GN=REL PE=3 SV=3
79	TI EIBKMA EIBKMA_BOVIN	5	217.87	0.012926775	0.059231287	1.969295689	0.863344416	Comp	2646	Programmed cell death 6 interacting protein OS=Bos taurus OX=9913 GN=PROC6IP PE=1 SV=3
80	TI AAQ3QIM3A1 AAQ3QIM3A1_BOVIN	4	145.56	0.012920712	0.059446488	1.392929823	0.861730164	Comp	2646	Tyrosine-protein kinase OS=Bos taurus OX=9913 GN=TKC PE=3 SV=1
81	QZ03C8 POL2_BOVIN	1	73.25	0.013002607	0.059446488	Infinity	Infinity	Comp	2646	P2Z and LIM domain protein 2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=PLM2 PE=2 SV=1
82	TI AAQ3QIM13 AAQ3QIM13_BOVIN	1	31.01	0.013209056	0.059558591	2.952286481	0.858424839	Comp	2646	NAD(P)H:hydroxyethyl epimerase OS=Bos taurus OX=9913 GN=NAE PE=3 SV=1
83	TI FAMVQ8 FAMVQ8_BOVIN GAMV0	8	507.28	0.013790515	0.060844218	1.386710154	0.851843371	Comp	2646	Undeclared protein OS=Bos taurus OX=9913 GN=FMG1-LUC12 PE=3 SV=3
84	PS2556 BURB_BOVIN FAA5QIM13	2	96.96	0.014029649	0.061045501	1.558193689	0.849168926	Comp	2646	Flavin reductase (NADPH) OS=Bos taurus OX=9913 GN=BUVR8 PE=1 SV=2
85	QZVD19 GMPFB_BOVIN F1N7H5.F1N	4	180.86	0.014352122	0.061812061	1.969307965	0.845592112	Comp	2646	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase beta OS=Bos taurus OX=9913 GN=MGPPB PE=2 SV=1
86	QZ2L93 MOHM_BOVIN	10	787.67	0.015173104	0.062962255	2.412988827	0.836638959	Comp	2646	Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Bos taurus OX=9913 GN=MDH2 PE=1 SV=1
87	TI QZNS1 QZNS1_BOVIN	2	100.71	0.015275476	0.062962255	3.239942762	0.835573735	Comp	2646	Protein transport protein Sec63 subunit beta OS=Bos taurus OX=9913 GN=SEC63B PE=1 SV=1
88	TI QALV7 QALV7_THEAN	1	51.75	0.015434307	0.062962255	2.107638465	0.833736055	Comp	2646	Peritremidoxin 1, putative OS=Thelliera annulata OX=5874 GN=FA1Z50 PE=3 SV=1
89	PR62251 MAPK_BOVIN F1MAZ1.F1M	4	159.98	0.015468105	0.062962255	2.267395455	0.8334734	Comp	2646	Microtubule-associated protein 4 OS=Bos taurus OX=9913 GN=MAP4 PE=1 SV=1
90	TI AAQ3QISLND0 AAQ3QISLND0_BOVIN	14	603.21	0.016259524	0.064210477	2.237426271	0.825123584	Comp	2646	Lymphocyte cytosolic protein 4 OS=Bos taurus OX=9913 GN=LCP1 PE=1 SV=1
91	QZBR7 TEBP_BOVIN FAA52DU1A	3	152.1	0.018108595	0.06629487	2.311057797	0.806356001	Comp	2646	Prostaglandin H synthase 3 OS=Bos taurus OX=9913 GN=PTGCS3 PE=1 SV=1
92	QZKX9 PRSS1_BOVIN	2	67.41	0.018130955	0.06629487	1.788887344	0.806153222	Comp	2646	Phosphatidylycerine synthase 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=PTDSS1 PE=2 SV=1
93	TI F1N2H2 F1N2H2_BOVIN	1	26.62	0.018298265	0.06629487	2.679142315	0.804488833	Comp	2646	Leucine rich repeat and Ig domain containing 3 OS=Bos taurus OX=9913 GN=LUNG3 PE=4 SV=3
94	TI EIB187 EIB187_BOVIN	3	113.35	0.018527577	0.06629487	5.999024071	0.802744878	Comp	2646	SCE33 homolog, protein translocation regulator OS=Bos taurus OX=9913 GN=SE33 PE=4 SV=1
95	ASPK45 GZT1_BOVIN	4	211.88	0.018586785	0.06629487	1.469157091	0.801668	Comp	2646	Protein arginyl galactosyltransferase 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=CGALTT1 PE=2 SV=1
96	TI F1M3X8 F1M3X8_BOVIN	4	176.53	0.01884411	0.067526743	2.805977622	0.79443093	Comp	2646	Signal transducer and activator of transcription OS=Bos taurus OX=9913 GN=STAT3 PE=3 SV=1
97	TI QZB6G1 QZB6G1_BOVIN	4	233.5	0.019371078	0.068344268	3.116013306	0.794120226	Comp	2646	Res-related protein Rab14 OS=Bos taurus OX=9913 GN=RAB14 PE=1 SV=2
98	QZSYVU EF2_BOVIN	18	1009.45	0.019673863	0.068344268	1.853548037	0.784434939	Comp	2646	Elongation factor 2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=EF2 PE=3 SV=3
99	TI AAQ3QIM73 AAQ3QIM73_BOVIN	2	64.49	0.020040983	0.068344268	3.961943707	0.781429117	Comp	2646	Undeclared protein OS=Bos taurus OX=9913 GN=RRP23 PE=3 SV=1
100	QZB7M5 UASP1_BOVIN	4	166.9	0.020731576	0.068344268	3.961943707	0.781429117	Comp	2646	LIM and SH3 domain protein 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=LASP1 PE=2 SV=1
101	QZT189 SOHB_BOVIN FAA5QIM207/	4	144.66	0.020988652	0.068344268	1.770284542	0.779873534	Comp	2646	Sucinate dehydrogenase [ubiquinol] non-sulfur subunit, mitochondrial OS=Bos taurus OX=9913 GN=SDH4 PE=4 SV=1
102	TI AAQ3QIM94 AAQ3QIM94_THEAN	1	29.62	0.021014979	0.068344268	1.884824044	0.778817534	Comp	2646	Undeclared protein OS=Thelliera annulata OX=5874 GN=FA1T_000144900 PE=4 SV=1
103	QZS544 GSL5_BOVIN FAA5QIM51/	14	922.65	0.021126861	0.068355779	1.921592925	0.777834323	Comp	2646	Gelsolin OS=Bos taurus OX=9913 GN=GSN PE=2 SV=1
104	QZB251 PIH2_BOVIN	4	274.66	0.022479092	0.071876402	2.134133472	0.76583711	Comp	2646	Peptidyl-HNA hydrolase 2, mitochondrial OS=Bos taurus OX=9913 GN=PIH2 PE=2 SV=1

105	tr E2R3M5 FERMV5_BOVIN	1	1	32.3	0.023703915	0.074245769	26.6413288	0.75356193	2666	Leucine rich alpha 2-glycoprotein 1 OS=taurus OX=9913 GN=LARG1 PE=1 SV=1
106	tr AA03Q1V03 AA03Q1V03_BOVIN	21	1	974.7	0.023877865	0.074245769	1.651980399	0.75386675	2666	Aminin OS=taurus OX=9913 GN=AMK6 PE=1 SV=1
107	P28801 G5TPI_BOVIN tr AA03Q1V05	6	6	361.3	0.024903906	0.075612885	2.62676964	0.76542757	2666	Glutathione S-transferase P OS=taurus OX=9913 GN=GSTP1 PE=1 SV=2
108	AA1M853 G0PA_BOVIN tr AA03Q1M08	5	3	179.01	0.024927819	0.075612885	1.72625319	0.76520118	2666	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=taurus OX=9913 GN=PDH1A PE=1 SV=1
109	tr E2R3M5 FERMV5_BOVIN	5	3	203.55	0.025157207	0.07576003	1.561081057	0.763399606	2666	Mitotin OS=taurus OX=9913 GN=MNT1 PE=3 SV=3
110	tr AA03Q1M04 AA03Q1M04_BOVIN	4	4	260.01	0.026110828	0.07706492	1.507891928	0.73575438	2666	Serine/threonine-protein phosphatase OS=taurus OX=9913 GN=PPP1CC PE=3 SV=1
111	tr G3K6L8 G3K6L8_THEAN	4	3	180.67	0.026431976	0.07706492	1.438470844	0.73234455	2666	Ubiquitin-ubiquitin-protein ligase OS=taurus OX=9913 GN=UHRF1A PE=4 SV=1
112	tr AA03Q1V02 AA03Q1V02_BOVIN	2	2	64.79	0.026848431	0.07706492	4.635360681	0.729969623	2666	Non-specific serine/threonine protein kinase OS=taurus OX=9913 GN=PK384 PE=4 SV=1
113	tr AA03Q1M02 AA03Q1M02_BOVIN	9	8	420.57	0.027076989	0.077244245	1.213135911	0.728235784	2666	Apoptotic chromatin condensation inducer 1 OS=taurus OX=9913 GN=ACN1 PE=4 SV=1
114	tr G2K54 G2K54_BOVIN	3	3	137.93	0.027422025	0.077244245	2.368426874	0.72529519	2666	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1 OS=taurus OX=9913 GN=DHS1 PE=2 SV=1
115	tr G2K54 G2K54_BOVIN	7	6	336.48	0.027342485	0.077251166	2.233365913	0.72254639	2666	Peptidylprolyl isomerase OS=taurus OX=9913 GN=PROX1 PE=2 SV=1
116	tr AA03Q1V02 AA03Q1V02_BOVIN	1	1	35.88	0.02838126	0.077601996	5.737355623	0.71873981	2666	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial OS=taurus OX=9913 GN=BDH1 PE=1 SV=2
117	tr AA03Q1V02 AA03Q1V02_BOVIN	4	3	129.22	0.028879564	0.07801161	2.871355623	0.714710826	2666	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Thellieria amuliana OX=5874 GN=1AT1.000034300 PE=3 SV=1
118	tr E2R3M5 FERMV5_BOVIN	10	10	588.43	0.028888257	0.07801161	1.664960645	0.713902661	2666	Nuclear cap binding protein subunit 1 OS=taurus OX=9913 GN=NCBP1 PE=3 SV=3
119	tr AA03Q1M04 AA03Q1M04_BOVIN	4	4	172.31	0.029741657	0.079274723	2.458217172	0.70844876	2666	Chemical binding protein 1 OS=taurus OX=9913 GN=CTBP1 PE=3 SV=1
120	tr E2R3M5 FERMV5_BOVIN	10	10	658.3	0.029808506	0.079274723	1.435530769	0.707962313	2666	Coproporphyrinogen oxidase OS=taurus OX=9913 GN=CPOX PE=1 SV=1
121	tr E2R3M5 FERMV5_BOVIN	14	14	648.86	0.029915575	0.079274723	2.140230779	0.707195872	2666	Leucine rich pentatricopeptide repeat containing OS=taurus OX=9913 GN=LRRPC PE=4 SV=3
122	tr AA03Q1M02 AA03Q1M02_BOVIN	3	1	240.33	0.031238466	0.08072233	1.352730205	0.697891954	2666	Serine/threonine-protein phosphatase pp2 delta catalytic subunit OS=taurus OX=9913 GN=PP2C G1
123	tr AA03Q1V03 AA03Q1V03_BOVIN	3	2	141.58	0.031346201	0.08072233	1.367311325	0.697147478	2666	TNA1 cytosolic granule associated RNA binding protein like 1 OS=taurus OX=9913 GN=TALI1 PE=4 SV=5
124	tr G0V045 S4MNH_BOVIN	2	2	87.95	0.032800204	0.082852971	2.779062184	0.687287412	2666	Deoxy nucleoside triphosphate triphosphatase SAMHD1 OS=taurus OX=9913 GN=SAMHD1 PE=2 SV=2
125	tr AA03Q1V03 AA03Q1V03_BOVIN	3	3	160.43	0.03321273	0.082852971	1.623795173	0.684551858	2666	28S ribosomal protein S29, mitochondrial OS=taurus OX=9913 GN=DAP3 PE=1 SV=3
126	tr AA03Q1V03 AA03Q1V03_BOVIN	8	7	394.43	0.034350443	0.082931851	1.220138842	0.677143714	2666	RCC2 protein OS=taurus OX=9913 GN=RCC2 PE=1 SV=1
127	tr E2R3M5 FERMV5_BOVIN	1	1	83.19	0.034403816	0.082931851	3.2424251428	0.678809987	2666	Protein S100A4 OS=taurus OX=9913 GN=S100A4 PE=1 SV=2
128	tr E2R3M5 FERMV5_BOVIN	4	3	184.35	0.03456648	0.082931851	2.606461128	0.675795087	2666	Hsp90 co-chaperone Cdc37 OS=taurus OX=9913 GN=C37 PE=2 SV=1
129	tr E2R3M5 FERMV5_BOVIN	2	2	110.33	0.03467234	0.082931851	2.274146407	0.675083805	2666	Retinol dehydrogenase 11 OS=taurus OX=9913 GN=RHD11 PE=3 SV=2
130	tr E2R3M5 FERMV5_BOVIN	19	18	1045.79	0.036122825	0.08472358	1.153321189	0.665964762	2666	Splicing factor 3b subunit 2 OS=taurus OX=9913 GN=SF3B2 PE=4 SV=1
131	tr E2R3M5 FERMV5_BOVIN	5	5	263.38	0.036282224	0.08472358	2.716423561	0.665030956	2666	Citrate synthase, mitochondrial OS=taurus OX=9913 GN=CS PE=1 SV=1
132	tr E2R3M5 FERMV5_BOVIN	3	2	156.35	0.036480091	0.08472358	1.473714883	0.664230423	2666	SEC23 homolog B, vesicle trafficking protein OS=taurus OX=9913 GN=SEC23B PE=3 SV=1
133	tr AA03Q1V03 AA03Q1V03_BOVIN	11	11	715.75	0.038648489	0.086902216	1.646129595	0.650331309	2666	Importin 5 OS=taurus OX=9913 GN=IP05 PE=1 SV=1
134	tr AA03Q1V03 AA03Q1V03_BOVIN	2	2	59.42	0.040448846	0.086902216	2.349828143	0.640531319	2666	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform OS=taurus OX=9913 GN=ATP1B2 PE=1 SV=3
135	tr AA03Q1M05 AA03Q1M05_BOVIN	17	15	871.87	0.040709984	0.086902216	1.898489128	0.639096652	2666	Signal transducer and activator of transcription OS=taurus OX=9913 GN=STAT1 PE=3 SV=1
136	tr E2R3M5 FERMV5_BOVIN	1	1	78.99	0.04197934	0.08735391	1.425395129	0.635257231	2666	Transcription protein SEC22 OS=taurus OX=9913 GN=SEC22 PE=3 SV=3
137	tr AA03Q1M06 AA03Q1M06_BOVIN	3	2	104.64	0.042359505	0.088571058	2.346755031	0.629823069	2666	Intracellular regulatory factor 4 OS=taurus OX=9913 GN=IRF4 PE=4 SV=1
138	tr E2R3M5 FERMV5_BOVIN	6	6	529.26	0.04412	0.091116916	1.924691386	0.620693166	2666	Ras-related protein Rbb-7a OS=taurus OX=9913 GN=RAB7A PE=1 SV=1
139	tr E2R3M5 FERMV5_BOVIN	1	1	35.33	0.045409166	0.092120864	3.111273995	0.614070495	2666	Fornin homolog 2 domain containing 1 OS=taurus OX=9913 GN=FHD1 PE=4 SV=3
140	tr AA03Q1M07 AA03Q1M07_BOVIN	8	8	331.22	0.04617669	0.093079347	1.697770322	0.610207042	2666	Malic enzyme OS=taurus OX=9913 GN=ME2 PE=3 SV=1
141	tr AA03Q1M04 AA03Q1M04_BOVIN	2	2	135.55	0.04662145	0.093083884	4.004045562	0.607929461	2666	Ubiquitin-ubiquitin-protein ligase OS=taurus OX=9913 GN=UHRF1A PE=4 SV=1
142	tr G0V045 S4MNH_BOVIN	2	2	76.35	0.047818463	0.093162895	2.798341415	0.60565639	2666	DEAD-box family helicase, putative OS=Thellieria amuliana OX=5874 GN=TAQ190 PE=4 SV=1
143	tr G0V045 S4MNH_BOVIN	4	4	179.51	0.047943711	0.093162895	1.93501398	0.60565639	2666	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 5 OS=taurus OX=9913 GN=ACSL5 PE=1 SV=1
144	tr AA03Q1M03 AA03Q1M03_BOVIN	4	4	211.78	0.048857376	0.093162895	1.650731389	0.597154974	2666	Ischaemic dehydrogenase (NAD) subunit, mitochondrial OS=taurus OX=9913 GN=IDH3A PE=3 SV=1
145	tr E2R3M5 FERMV5_BOVIN	2	2	101.29	0.049238607	0.093250279	2.394419825	0.595325276	2666	Pyruvate metalloprotease 1 OS=taurus OX=9913 GN=MMP2 PE=3 SV=2
146	tr E2R3M5 FERMV5_BOVIN	1	1	49.76	0.04963335	0.09375663	1.252704984	0.593492908	2666	28S ribosomal protein S2, mitochondrial OS=taurus OX=9913 GN=MMP2 PE=1 SV=2

ANNEXE 3 : *T. annulata* : un habile « séquestreur »

Le concept de « séquestration » par *T. annulata* a été déjà décrit dans de nombreux exemples : IKK, p53, Clasp1...^{5,40,57} Il détourne des protéines de l'hôte soit pour se protéger des mécanismes dans lesquels elles sont impliquées, soit pour se servir de celles-ci pour ses propres besoins. Dans notre étude visant à caractériser l'impact physiologique et fonctionnel du composé MC2646, sur la survie du parasite et l'infection (cf Partie III résultats), nous avons observé que la protéine cible du composé se trouvait à côté des noyaux parasitaires. Nous avons décidé d'étudier certains hits obtenus par la Spectrométrie de masse du Pull down du composé et en parallèle, nous avons recherché parmi les protéines déjà connues comme séquestrées par *T. annulata*, si l'une d'entre elles pouvait être la protéine cible de MC2646, ce qui nous a permis d'en découvrir de nouvelles.

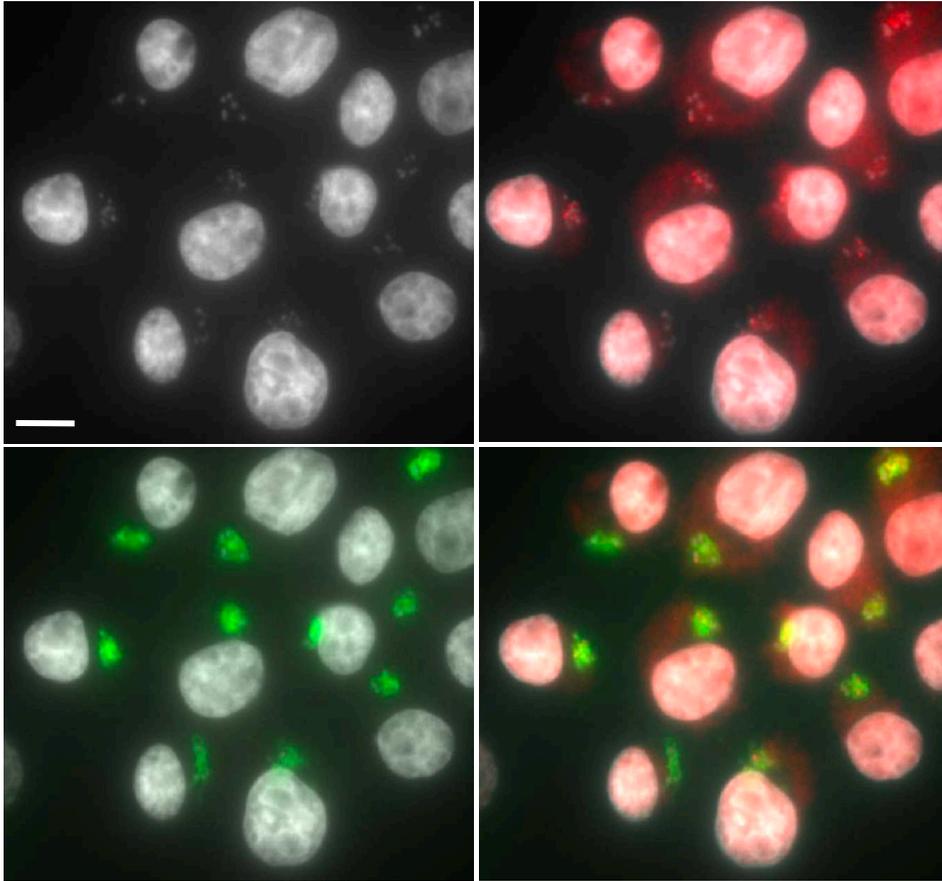
a) Différents profils de séquestration

(i) Séquestration au niveau du syncycium parasitaire : comme précédemment décrit dans la littérature, notamment par Kerry Woods, des protéines bovines vont être séquestrées à la surface du schizonte de *T. annulata*. C'est le cas de CD2AP mais aussi de Clasp1 qui de par son interaction avec les microtubules, va permettre à *T. annulata* de se diviser en même temps que la cellule hôte.⁵⁷ Le signal click de la cible du composé après traitement MC2646 est autour de ce qu'il reste de parasites, nous avons donc voulu dans un premier temps vérifier si ce signal pouvait colocaliser avec une protéine bovine séquestrée à la surface du schizonte et notamment avec Clasp1 et CD2AP. Plusieurs anticorps de p53 ont également été testés, mais chacun a donné un signal différent, nous empêchant d'émettre une réelle conclusion.

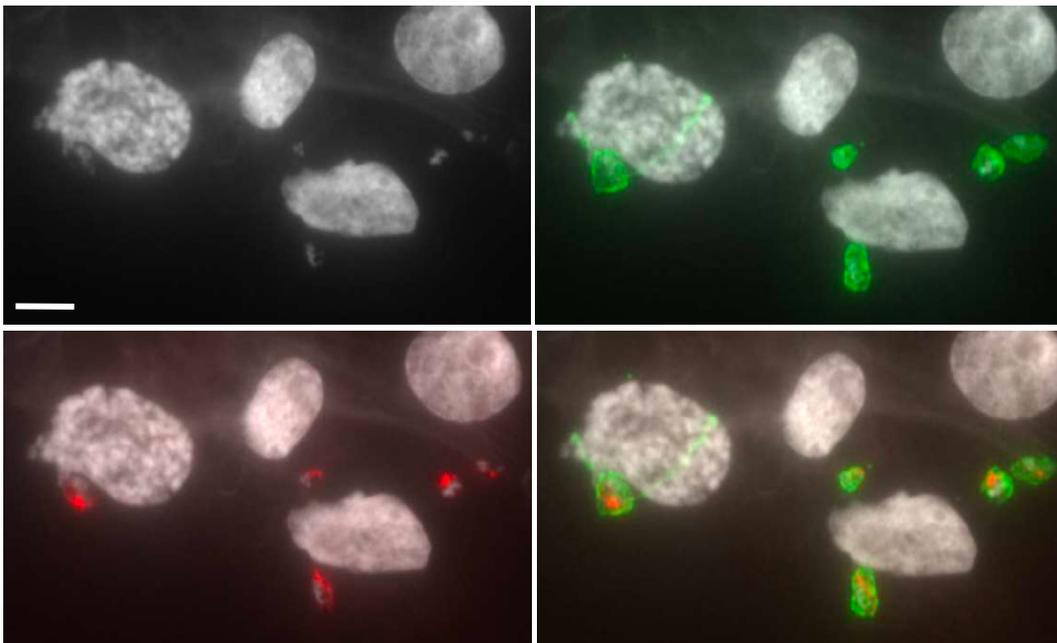
Clasp1 et CD2AP recouvrent bien la surface du parasite dans une condition contrôle, non traitée, et le click est toujours à côté des noyaux parasitaires. Après traitement MC2646, le signal Clasp1 et CD2AP diminue conjointement au nombre de parasites mais il ne colocalise pas avec MC4404 qui se trouve à l'intérieur de ce marqueur de la surface du schizonte : ils ne semblent même pas être sur le même plan mais, il faudrait confirmer cela au microscope confocal. Des protéines parasitaires ont aussi déjà été caractérisées à la surface du schizonte, c'est le cas de Tasp ou p104. Que ce soit avant ou après traitement MC2646, nous n'avons pu observer une colocalisation de signal avec le click : ce dernier étant « à l'intérieur » du parasite, comparé aux protéines marquant la surface du parasite.

a)

TBL3-Clasp1-Click



TBL3-Clasp1-Click+ MC2646



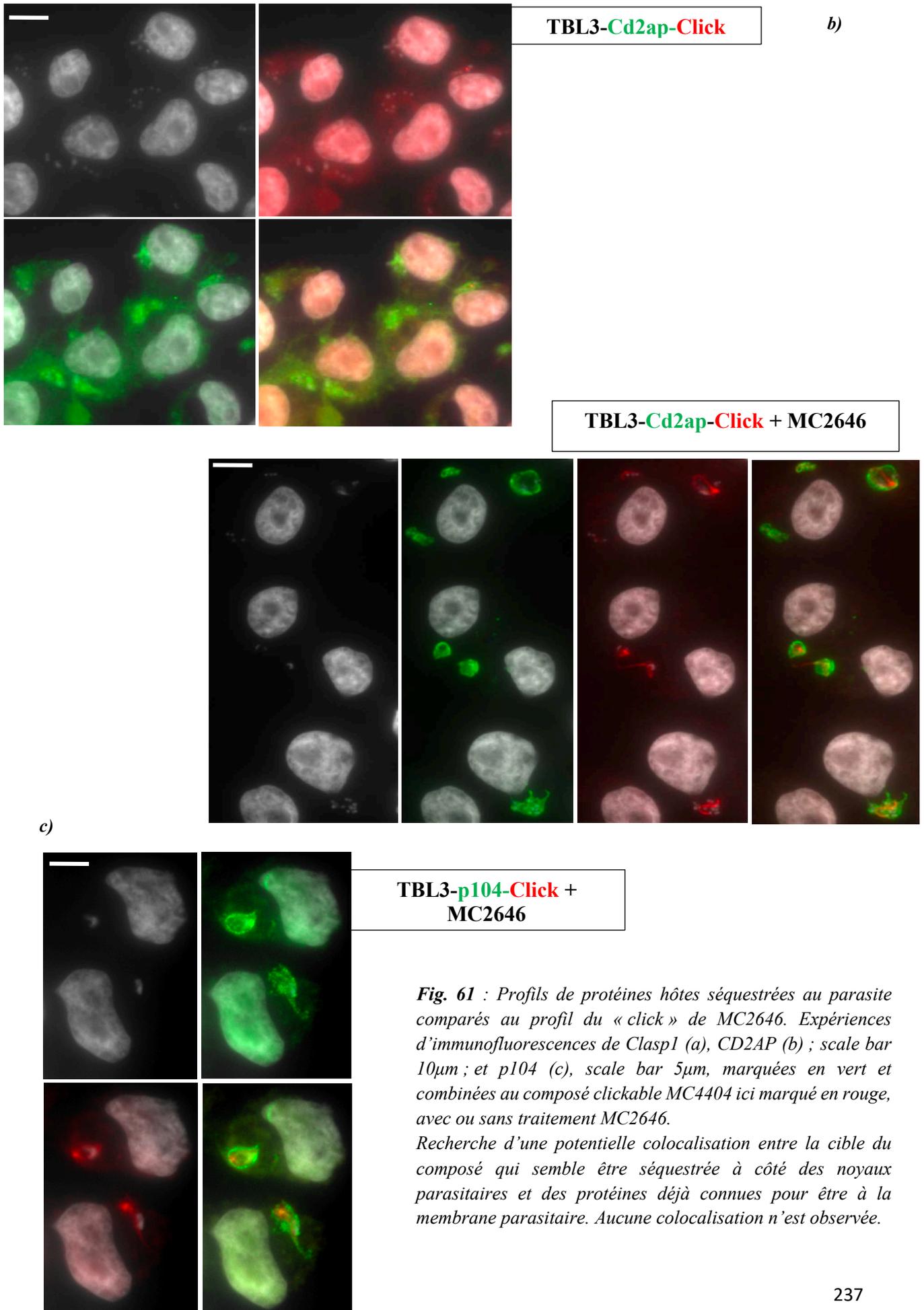


Fig. 61 : Profils de protéines hôtes séquestrées au parasite comparés au profil du « click » de MC2646. Expériences d'immunofluorescences de Clasp1 (a), CD2AP (b) ; scale bar 10µm ; et p104 (c), scale bar 5µm, marquées en vert et combinées au composé clickable MC4404 ici marqué en rouge, avec ou sans traitement MC2646. Recherche d'une potentielle colocalisation entre la cible du composé qui semble être séquestrée à côté des noyaux parasitaires et des protéines déjà connues pour être à la membrane parasitaire. Aucune colocalisation n'est observée.

(ii) Séquestration à côté ou entre les noyaux parasitaires :

Tout comme la protéine cible de MC2646, nous avons découvert d'autres protéines avec des profils ne recouvrant pas la surface du schizonte mais plutôt retrouvées « à l'intérieur » du syncitium, sous la surface de la membrane ou à côté des noyaux parasitaires. C'est d'ailleurs le cas de ATG16L1, que nous avons été amenés à tester pour ses interactions connues avec le Complément C3¹⁶⁸. ATG16L1 pour « autophagy 16 like 1 » est une protéine caractérisée comme une sous-unité d'un complexe lié à l'autophagie, elle est essentiellement importante pour la lipodation de LC3 et la formation de l'autophagosome. Aussi, l'interaction entre C3 et ATG16L1 a été décrite comme primordiale pour la fusion aux lysosomes et l'activation de l'autophagie dans les cellules.

En réalisant une IF de ATG16L1, combinée au click, nous avons pu voir que cette protéine était elle aussi séquestrée par le parasite entre les noyaux parasitaires, mais elle ne colocalise pas avec la cible de MC2646 même après traitement.

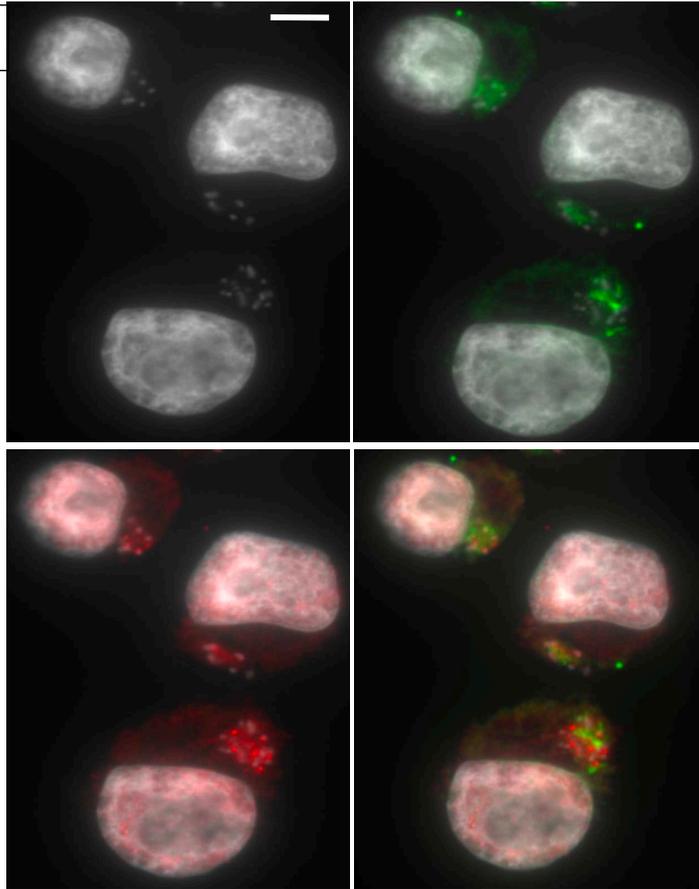
Nous nous sommes demandés si les protéines séquestrées pouvaient se trouver dans les structures « annulate lamellae » dont le marqueur est l'anticorps de pores nucléaires mAB414. Nous avons combiné une immunofluorescence de mAB414 avec une immunofluorescence de eIF5A ou avec le composé click afin de voir si la cible de MC2646 pouvait être séquestrée dans les structures « annulate lamellae ». La même expérience a été faite entre mAB414 et ATG16L1. Ni eIF5A, ni le composé click, ni ATG16L1 ne colocalisent avec mAB414, même après traitement MC2646, laissant penser que ces protéines sont dans des structures encore différentes des AL. Les profils des signaux de mAB414 et ATG16L1 sont très proches, ils se ressemblent énormément mais leur localisation est pourtant différente. Concernant MC4404 et mAB414, leurs signaux sont mutuellement exclusifs ; après traitement MC2646, la protéine cible de MC2646 se retrouve à l'intérieur du signal de mAB414.

Il serait intéressant de confirmer ces résultats au microscope confocal afin de pouvoir conclure sur l'emplacement des protéines les unes par rapport aux autres. Il y a une nette différence entre les protéines à la surface du schizonte et celles dans le parasite, bien que proches de la surface, dans les « annulate lamellae ».

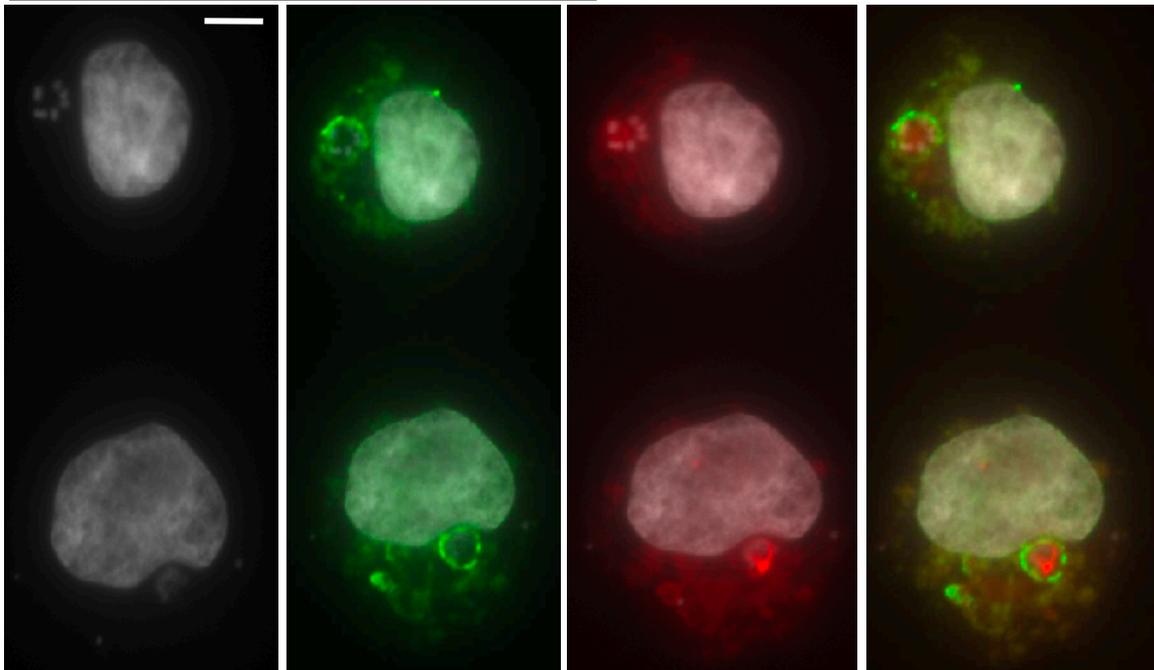
Il existe un troisième type de signal, celui de la cible de MC2646, et de eIF5A, qui est fort et concentré en points à côté des noyaux parasitaires. Ces protéines sont peut-être séquestrées dans des structures encore inconnues.

a)

TBL3-mAB414-Click

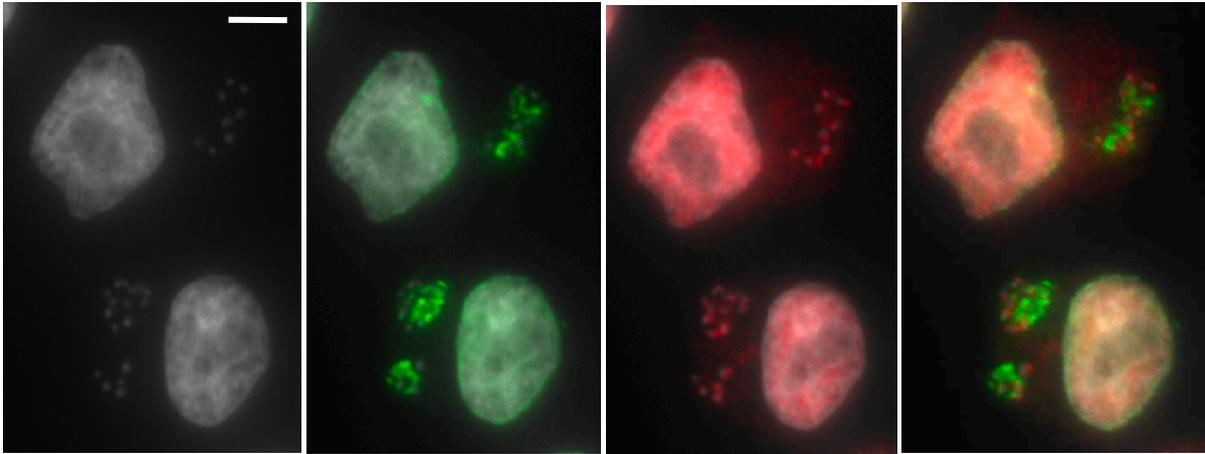


TBL3-mAB414-Click + MC2646



b)

TBL3-mAB414-eIF5A



TBL3-mAB414-eIF5A + MC2646

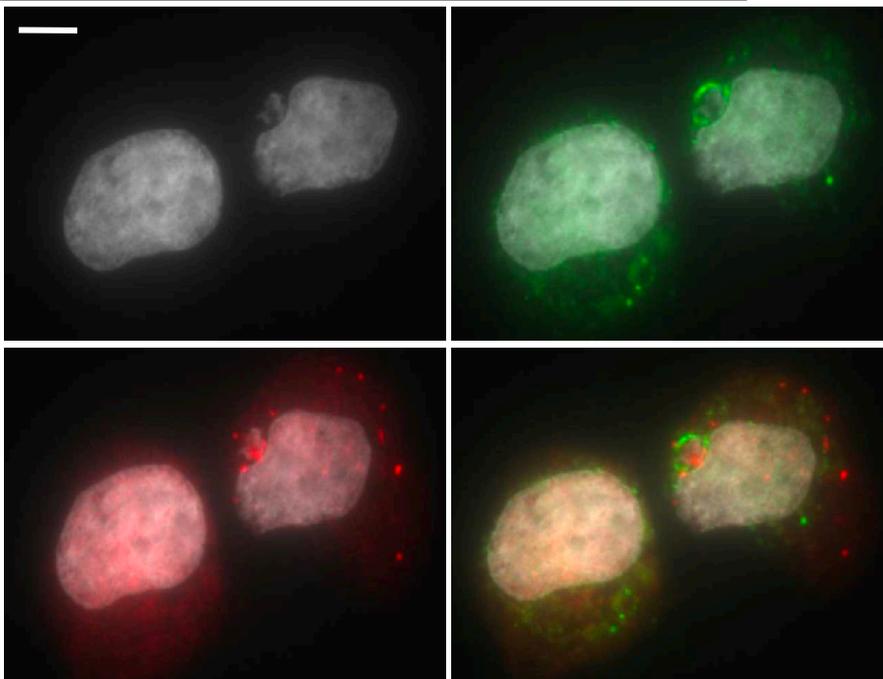


Fig. 62 : Profils des protéines eIF5A, ATG16L1 et la cible de MC2646 séquestrées au parasite différent du marquage des AL. Expériences d'immunofluorescences de mAB414(vert), marqueur des AL, en condition contrôle, et traitée MC2646.

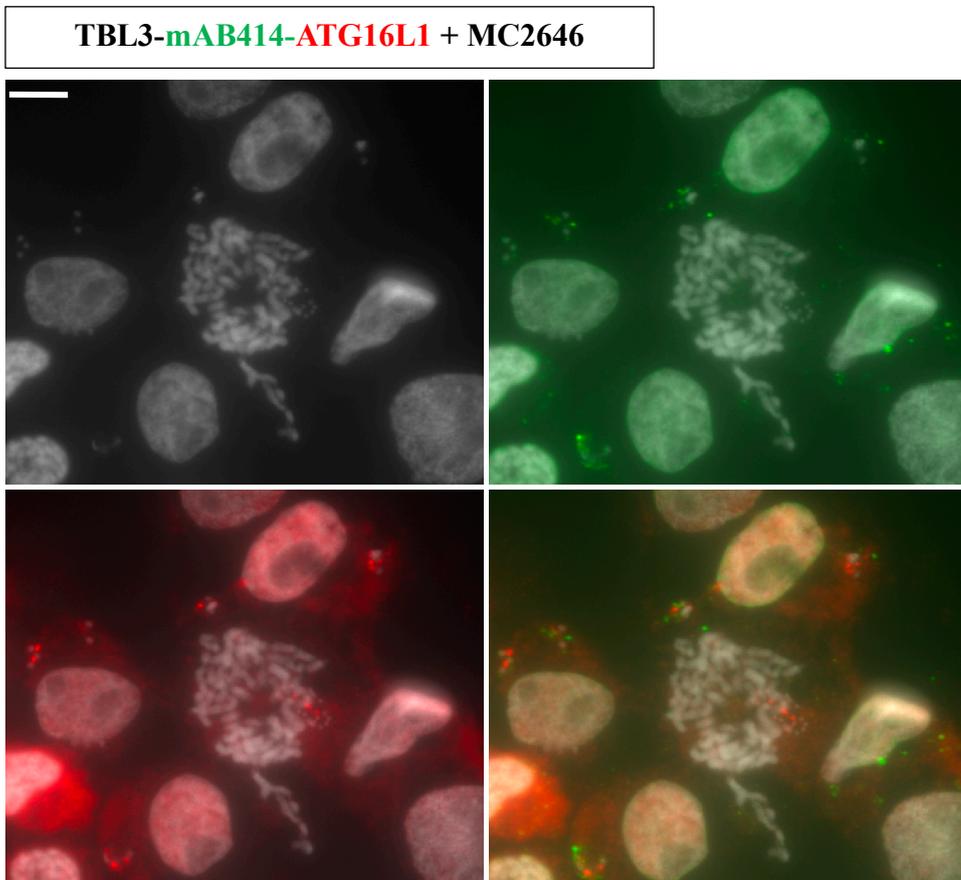
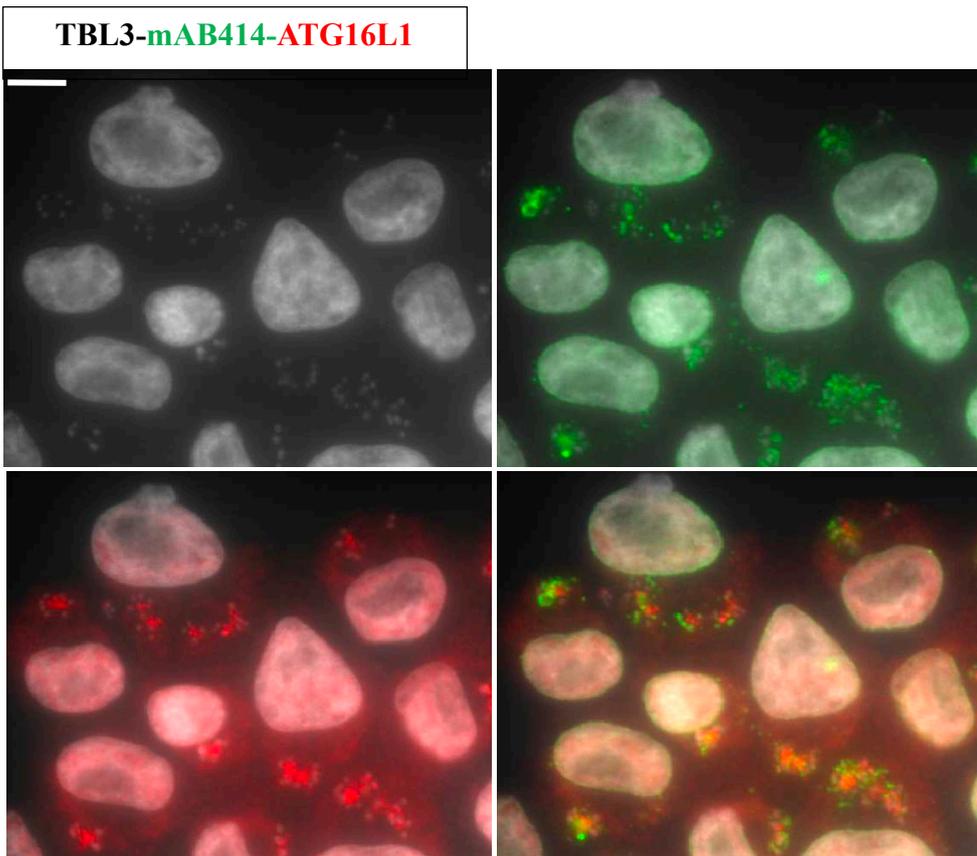
a) IF mAB414 combinée au composé clickable MC4404(rouge). Après traitement MC2646, le signal est dans le parasite et est entouré par la protéine mAB414. Scale bar 5 μ m.

b) La protéine eIF5A marquée en rouge est concentrée en points à côté des noyaux parasitaires alors que mAB414 (en vert) est entre les noyaux parasitaires. Après traitement MC2646, eIF5a est relarguée dans le cytoplasme alors que mab414 encercle ce qu'il reste de parasite. Scale bar 5 μ m.

c) IF mAB414 combinée à la protéine ATG16L1(rouge). Les profils ATG16L1 et mAB414 sont très ressemblant mais ne colocalisent pas pour autant. Scale bar 10 μ m.

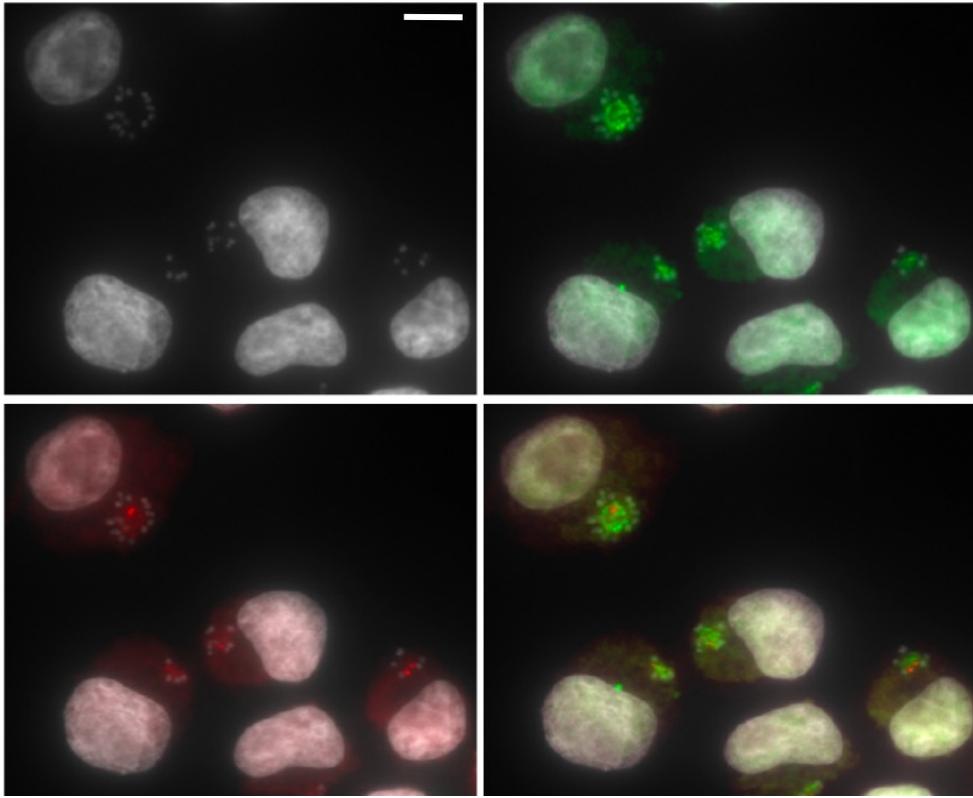
d) IF ATG16L1 combinée au click, le signal ne colocalise pas avec ou sans traitement MC2646. Scale bar 10 μ m (Ctrl) et 5 μ m (MC2646).

c)

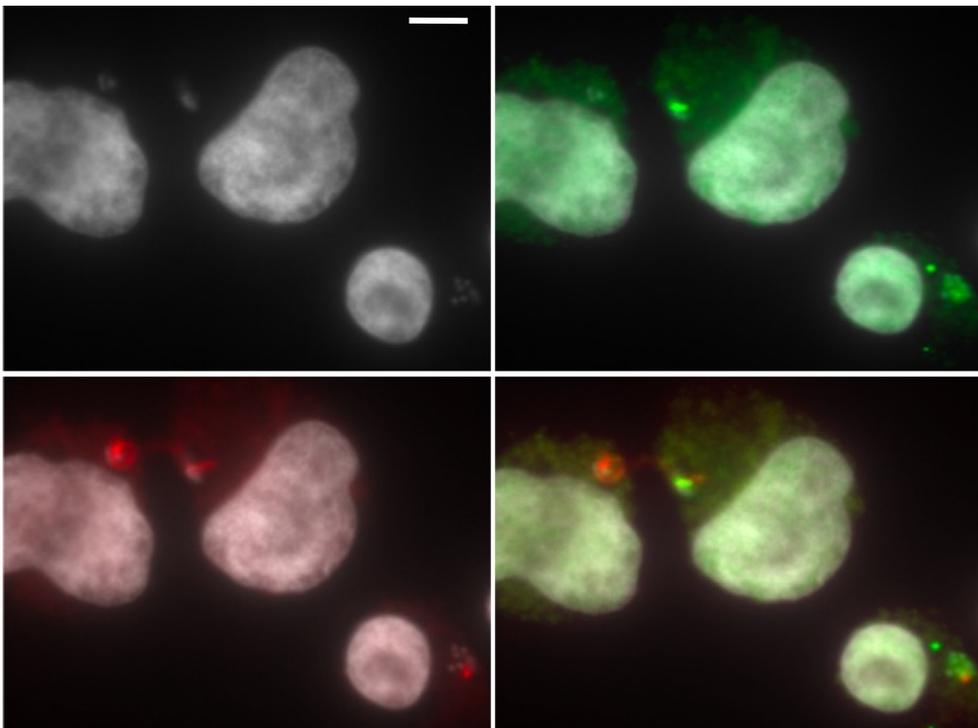


d)

TBL3-ATG16L1-Click



TBL3-ATG16L1-Click + MC2646



Références

1. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science (80-)*. 1994;266(5182). doi:10.1126/science.7545954
2. Oh JK, Weiderpass E. Infection and cancer: Global distribution and burden of diseases. *Ann Glob Heal*. 2014;80(5). doi:10.1016/j.aogh.2014.09.013
3. Chaussepied M, Langsley G. Theileria transformation of bovine leukocytes: A parasite model for the study of lymphoproliferation. *Res Immunol*. 1996;147(3). doi:10.1016/0923-2494(96)83165-8
4. Lizundia R, Chaussepied M, Huerre M, Werling D, Di Santo JP, Langsley G. c-Jun NH2-terminal kinase/c-Jun signaling promotes survival and metastasis of B lymphocytes transformed by Theileria. *Cancer Res*. 2006;66(12):6105-6110. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3861
5. Haller D, MacKiewicz M, Gerber S, et al. Cytoplasmic sequestration of p53 promotes survival in leukocytes transformed by Theileria. *Oncogene*. 2010;29(21):3079-3086. doi:10.1038/onc.2010.61
6. Ivanov V, Stein B, Baumann I, Dobbelaere DA, Herrlich P, Williams RO. Infection with the intracellular protozoan parasite Theileria parva induces constitutively high levels of NF-kappa B in bovine T lymphocytes. *Mol Cell Biol*. 1989;9(11). doi:10.1128/mcb.9.11.4677-4686.1989
7. Dessauge F, Hilaly S, Baumgartner M, Blumen B, Werling D, Langsley G. c-Myc activation by Theileria parasites promotes survival of infected B-lymphocytes. *Oncogene*. 2005;24(6). doi:10.1038/sj.onc.1208314
8. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science (80-)*. 2005;307(5717). doi:10.1126/science.1104816
9. Hooper L V., Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science (80-)*. 2001;292(5519). doi:10.1126/science.1058709
10. Temah CT. Les déterminants de l'épidémie du VIH/SIDA en Afrique subsaharienne. *Rev Econ Dev*. 2009;23(1-2). doi:10.3917/edd.231.0073
11. Seeber F, Steinfelder S. Recent advances in understanding apicomplexan parasites. *F1000Research*. 2016;5:1369. doi:10.12688/f1000research.7924.1
12. Beck HP, Blake D, Dardé ML, et al. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. *Int J Parasitol*. 2009;39(2). doi:10.1016/j.ijpara.2008.10.001

13. Fast NM, Kissinger JC, Roos DS, Keeling PJ. Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids. *Mol Biol Evol.* 2001;18(3). doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a003818
14. Chaudhary K, Darling JA, Fohl LM, et al. Purine salvage pathways in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 2004;279(30). doi:10.1074/jbc.M404232200
15. Morisaki JH, Heuser JE, Sibley LD. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Sci.* 1995;108 (Pt 6:2457-2464.
16. Jan G, Delorme V, David V, et al. The toxofilin-actin-PP2C complex of *Toxoplasma*: Identification of interacting domains. *Biochem J.* 2007;401(3). doi:10.1042/BJ20061324
17. Hakimi MA, Olias P, Sibley LD. *Toxoplasma* effectors targeting host signaling and transcription. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(3):615-644. doi:10.1128/CMR.00005-17
18. Soldati D, Dubremetz JF, Lebrun M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 2001;31(12):1293-1302. doi:10.1016/s0020-7519(01)00257-0
19. Elliott DA, Coleman DJ, Lane MA, May RC, Machesky LM, Clark DP. *Cryptosporidium parvum* infection requires host cell actin polymerization. *Infect Immun.* 2001;69(9). doi:10.1128/IAI.69.9.5940-5942.2001
20. Shaw MK, Tilney LG, Musoke AJ. The entry of *Theileria parva* sporozoites into bovine lymphocytes: Evidence for MHC class I involvement. *J Cell Biol.* 1991;113(1). doi:10.1083/jcb.113.1.87
21. Dobbelaere D, Heussler V. Transformation of leukocytes by *Theileria parva* and *T. annulata*. *Annu Rev Microbiol.* 1999;53. doi:10.1146/annurev.micro.53.1.1
22. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell.* 2016;167(3):610-624. doi:10.1016/j.cell.2016.07.055
23. Pasternak ND, Dzikowski R. PfEMP1: An antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(7):1463-1466. doi:10.1016/J.BIOCEL.2008.12.012
24. Scherf A, Lopez-Rubio JJ, Riviere L. Antigenic Variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62(1):445-470. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093134

25. Hollin T, Gupta M, Lenz T, Le Roch KG. Dynamic Chromatin Structure and Epigenetics Control the Fate of Malaria Parasites. *Trends Genet.* 2021;37(1). doi:10.1016/j.tig.2020.09.003
26. Batugedara G, Lu XM, Bunnik EM, Le Roch KG. The Role of Chromatin Structure in Gene Regulation of the Human Malaria Parasite. *Trends Parasitol.* 2017;33(5). doi:10.1016/j.pt.2016.12.004
27. Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(11):766-778. doi:10.1038/nrmicro2858
28. Plattner F, Soldati-Favre D. Hijacking of host cellular functions by the apicomplexa. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62:471-487. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162802
29. Certad G, Viscogliosi E, Chabé M, Cacciò SM. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends Parasitol.* 2017;33(7):561-576. doi:10.1016/j.pt.2017.02.006
30. Gharbi M, Mhadhbi M, Darghouth MA. Diagnostic de la theilériose tropicale du bœuf (infection par *Theileria annulata*) en Afrique du Nord. *Rev Med Vet (Toulouse).* 2012;163(12).
31. Fell AH, Preston PM. Proliferation of *theileria annulata* and *Theileria parva* macroschizont-infected bovine cells in scid mice. *Int J Parasitol.* 1993;23(1). doi:10.1016/0020-7519(93)90100-D
32. Tretina K, Gotia HT, Mann DJ, Silva JC. *Theileria*-transformed bovine leukocytes have cancer hallmarks. *Trends Parasitol.* 2015;31(7):306-314. doi:10.1016/j.pt.2015.04.001
33. Dobbelaere DA, Küenzi P. The strategies of the *Theileria* parasite: a new twist in host-pathogen interactions. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(4):524-530. doi:10.1016/j.coi.2004.05.009
34. Brown WC, Zhao S, Logan KS, Grab DJ, Rice-Ficht AC. Identification of candidate vaccine antigens of bovine hemoparasites *Theileria parva* and *Babesia bovis* by use of helper T cell clones. *Vet Parasitol.* 1995;57(1-3). doi:10.1016/0304-4017(94)03120-L
35. Preston P, Hall R, Glass E, et al. Innate and adaptive immune responses co-operate to protect cattle against *Theileria annulata*. In: *Parasitology Today.* Vol 15. ; 1999. doi:10.1016/S0169-4758(99)01466-0
36. Campbell JD, Nichani AK, Brown DJ, Howie SE, Spooner RL, Glass EJ. Parasite-mediated steps in immune response failure during primary *Theileria annulata* infection. *Trop Anim Health Prod.* 1997;29(4 Suppl). doi:10.1007/bf02632953

37. Chaussepied M, Lallemand D, Moreau MF, Adamson R, Hall R, Langsley G. Upregulation of Jun and Fos family members and permanent JNK activity lead to constitutive AP-1 activation in Theileria-transformed leukocytes. *Mol Biochem Parasitol.* 1998;94(2). doi:10.1016/S0166-6851(98)00070-X
38. Latré De Laté P, Haidar M, Ansari H, et al. *Theileria* highjacks JNK2 into a complex with the macroschizont GPI (GlycosylPhosphatidylInositol)-anchored surface protein p104. *Cell Microbiol.* 2019;21(3):e12973. doi:10.1111/cmi.12973
39. Oren M. Decision making by p53: Life, death and cancer. *Cell Death Differ.* 2003;10(4). doi:10.1038/sj.cdd.4401183
40. Heussler VT, Rottenberg S, Schwab R, et al. Hijacking of host cell IKK signalosomes by the transforming parasite *Theileria*. *Science.* 2002;298(5595):1033-1036. doi:10.1126/science.1075462
41. Schmuckli-Maurer J, Kinnaird J, Pillai S, et al. Modulation of NF- κ B activation in *Theileria annulata*-infected cloned cell lines is associated with detection of parasite-dependent IKK signalosomes and disruption of the actin cytoskeleton. *Cell Microbiol.* 2010;12(2). doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01386.x
42. Sun Z, Andersson R. NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock.* 2002;18(2).
43. Gabay M, Li Y, Felsher DW. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(6). doi:10.1101/cshperspect.a014241
44. Hakimi M ali, Cannella D. Apicomplexan parasites and subversion of the host cell microRNA pathway. *Trends Parasitol.* 2011;27(11). doi:10.1016/j.pt.2011.07.001
45. Marsolier J, Pineau S, Medjkane S, et al. OncomiR Addiction Is Generated by a miR-155 Feedback Loop in *Theileria*-Transformed Leukocytes. Ullu E, ed. *PLoS Pathog.* 2013;9(4):e1003222. doi:10.1371/journal.ppat.1003222
46. Medjkane S, Weitzman JB. A reversible Warburg effect is induced by *Theileria* parasites to transform host leukocytes. *Cell Cycle.* 2013;12(14). doi:10.4161/cc.25540
47. Medjkane S, Perichon M, Marsolier J, Dairou J, Weitzman JB. *Theileria* induces oxidative stress and HIF1 α activation that are essential for host leukocyte transformation. *Oncogene.* 2014;33(14). doi:10.1038/onc.2013.134
48. Metheni M, Echebli N, Chaussepied M, et al. The level of H₂O₂ type oxidative stress regulates virulence of theileria-transformed leukocytes. *Cell Microbiol.* 2014;16(2). doi:10.1111/cmi.12218

49. Swan DG, Phillips K, Tait A, Shiels BR. Evidence for localisation of a *Theileria* parasite AT hook DNA-binding protein to the nucleus of immortalised bovine host cells. *Mol Biochem Parasitol.* 1999;101(1-2). doi:10.1016/S0166-6851(99)00064-X
50. Shiels BR, McKellar S, Katzer F, et al. A *Theileria annulata* DNA binding protein localized to the host cell nucleus alters the phenotype of a bovine macrophage cell line. *Eukaryot Cell.* 2004;3(2):495-505. doi:10.1128/EC.3.2.495-505.2004
51. Schneider I, Haller D, Kullmann B, Beyer D, Ahmed JS, Seitzer U. Identification, molecular characterization and subcellular localization of a *Theileria annulata* parasite protein secreted into the host cell cytoplasm. *Parasitol Res.* 2007;101(6). doi:10.1007/s00436-007-0663-z
52. Marsolier J, Perichon M, Weitzman JB, Medjkane S. Secreted parasite Pin1 isomerase stabilizes host PKM2 to reprogram host cell metabolism. *Commun Biol.* 2019;2(1). doi:10.1038/s42003-019-0386-6
53. Marsolier J, Perichon M, DeBarry JD, et al. *Theileria* parasites secrete a prolyl isomerase to maintain host leukocyte transformation. *Nature.* 2015;520(7547):378-382. doi:10.1038/nature14044
54. Cock-Rada AM, Medjkane S, Janski N, et al. SMYD3 promotes cancer invasion by epigenetic upregulation of the metalloproteinase MMP-9. *Cancer Res.* 2012;72(3):810-820. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1052
55. Cheeseman K, Weitzman JB. Host-parasite interactions: An intimate epigenetic relationship. *Cell Microbiol.* 2015;17(8):1121-1132. doi:10.1111/cmi.12471
56. von Schubert C, Xue G, Schmuckli-Maurer J, Woods KL, Nigg EA, Dobbelaere DAE. The transforming parasite *Theileria* Co-opts host cell mitotic and central spindles to persist in continuously dividing cells. *PLoS Biol.* 2010;8(9). doi:10.1371/journal.pbio.1000499
57. Huber S, Theiler R, de Quervain D, et al. The Microtubule-Stabilizing Protein CLASP1 Associates with the *Theileria annulata* Schizont Surface via Its Kinetochore-Binding Domain. *mSphere.* 2017;2(4). doi:10.1128/mSphere.00215-17
58. Huber S, Karagenc T, Ritler D, Rottenberg S, Woods K. Identification and characterisation of a *Theileria annulata* proline-rich microtubule and SH3 domain-interacting protein (TaMISHIP) that forms a complex with CLASP1, EB1, and CD2AP at the schizont surface. *Cell Microbiol.* 2018;20(7). doi:10.1111/cmi.12838
59. Flynn DC. Adaptor proteins. *Oncogene.* 2001;20(44 REV. ISS. 5). doi:10.1038/sj.onc.1204769

60. Seitzer U, Gerber S, Beyer D, et al. Schizonts of *Theileria annulata* interact with the microtubuli network of their host cell via the membrane protein TaSP. *Parasitol Res.* 2010;106(5). doi:10.1007/s00436-010-1747-8
61. Huber S, Bär A, Epp S, et al. Recruitment of Host Nuclear Pore Components to the Vicinity of *Theileria* Schizonts. Sinnis P, ed. *mSphere*. 2020;5(1). doi:10.1128/mSphere.00709-19
62. Wiens O, Xia D, Von Schubert C, et al. Cell cycle-dependent phosphorylation of *Theileria annulata* schizont surface proteins. *PLoS One*. 2014;9(7). doi:10.1371/journal.pone.0103821
63. Dhar S, Malhotra D V., Bhushan C, Gautam OP. Chemotherapy of *Theileria annulata* infection with buparvaquone. *Vet Rec.* 1986;119(25-26). doi:10.1136/vr.119.25-26.635
64. Salim B, Chatanga E, Jannot G, Mossaad E, Nakao R, Weitzman JB. Mutations in the TaPIN1 peptidyl prolyl isomerase gene in *Theileria annulata* parasites isolated in Sudan. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2019;11. doi:10.1016/j.ijpddr.2019.11.001
65. McKeever DJ. Live immunisation against *Theileria parva*: containing or spreading the disease? *Trends Parasitol.* 2007;23(12). doi:10.1016/j.pt.2007.09.002
66. Noble D. Conrad Waddington and the origin of epigenetics. *J Exp Biol.* 2015;218(6). doi:10.1242/jeb.120071
67. Deichmann U. Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic. *Dev Biol.* 2016;416(1). doi:10.1016/j.ydbio.2016.06.005
68. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* Published online 2009. doi:10.1101/gad.1787609
69. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 2011;25(10):1010-1022. doi:10.1101/gad.2037511
70. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res 2011 213.* 2011;21(3):381-395. doi:10.1038/cr.2011.22
71. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell.* 2007;128(4):693-705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005
72. Carlson SM, Gozani O. Nonhistone Lysine Methylation in the Regulation of Cancer Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(11):a026435. doi:10.1101/cshperspect.a026435
73. Mazur PK, Reynoird N, Khatri P, et al. SMYD3 links lysine methylation of MAP3K2 to Ras-driven cancer. *Nature.* 2014;510(7504). doi:10.1038/nature13320

74. Villares M, Berthelet J, Weitzman JB. The clever strategies used by intracellular parasites to hijack host gene expression. *Semin Immunopathol.* 2020;42(2). doi:10.1007/s00281-020-00779-z
75. Wu Z, Connolly J, Biggar KK. Beyond histones - the expanding roles of protein lysine methylation. *FEBS J.* 2017;284(17):2732-2744. doi:10.1111/febs.14056
76. Dillon SC, Zhang X, Trievel RC, Cheng X. The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol.* 2005;6(8):227. doi:10.1186/gb-2005-6-8-227
77. Robert McMaster W, Morrison CJ, Kobor MS. Epigenetics: A New Model for Intracellular Parasite–Host Cell Regulation. *Trends Parasitol.* 2016;32(7):515-521. doi:10.1016/j.pt.2016.04.002
78. Lecoeur H, Prina E, Rosazza T, et al. Targeting Macrophage Histone H3 Modification as a Leishmania Strategy to Dampen the NF- κ B/NLRP3-Mediated Inflammatory Response. *Cell Rep.* 2020;30(6). doi:10.1016/j.celrep.2020.01.030
79. Cheeseman K, Jannot G, Lourenço N, et al. Dynamic methylation of histone H3K18 in differentiating Theileria parasites. *Nat Commun.* 2021;12(1). doi:10.1038/s41467-021-23477-2
80. Silmon de Monerri NC, Kim K. Pathogens Hijack the Epigenome. *Am J Pathol.* 2014;184(4):897-911. doi:10.1016/j.ajpath.2013.12.022
81. Husmann D, Gozani O. Histone lysine methyltransferases in biology and disease. *Nat Struct Mol Biol.* 2019;26(10):880-889. doi:10.1038/s41594-019-0298-7
82. Jiang L, Mu J, Zhang Q, et al. PfSETvs methylation of histone H3K36 represses virulence genes in Plasmodium falciparum. *Nature.* 2013;499(7457). doi:10.1038/nature12361
83. Hviid L, Jensen ATR. PfEMP1 – A Parasite Protein Family of Key Importance in Plasmodium falciparum Malaria Immunity and Pathogenesis. In: *Advances in Parasitology.* Vol 88. ; 2015:51-84. doi:10.1016/bs.apar.2015.02.004
84. Sautel CF, Cannella D, Bastien O, et al. SET8-Mediated Methylations of Histone H4 Lysine 20 Mark Silent Heterochromatic Domains in Apicomplexan Genomes. *Mol Cell Biol.* 2007;27(16). doi:10.1128/mcb.00482-07
85. Sindikubwabo F, Ding S, Hussain T, et al. Modifications at K31 on the lateral surface of histone H4 contribute to genome structure and expression in apicomplexan parasites. *Elife.* 2017;6. doi:10.7554/eLife.29391

86. Pivovarova Y, Liu J, Lesigang J, et al. Structure of a Novel Dimeric SET Domain Methyltransferase that Regulates Cell Motility. *J Mol Biol.* 2018;430(21):4209-4229. doi:10.1016/j.jmb.2018.08.017
87. Morera L, Lübbert M, Jung M. Targeting histone methyltransferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy. *Clin Epigenetics.* 2016;8(1):57. doi:10.1186/s13148-016-0223-4
88. Copeland RA. Protein methyltransferase inhibitors as precision cancer therapeutics: a decade of discovery. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2018;373(1748). doi:10.1098/rstb.2017.0080
89. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/J.CELL.2011.02.013
90. Lamotte S, Späth GF, Rachidi N, Prina E. The enemy within: Targeting host–parasite interaction for antileishmanial drug discovery. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(6). doi:10.1371/journal.pntd.0005480
91. Chua MJ, Arnold MSJ, Xu W, et al. Effect of clinically approved HDAC inhibitors on Plasmodium, Leishmania and Schistosoma parasite growth. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2017;7(1). doi:10.1016/j.ijpddr.2016.12.005
92. Stazi G, Zwergel C, Valente S, Mai A. LSD1 inhibitors: A patent review (2010-2015). *Expert Opin Ther Pat.* 2016;26(5). doi:10.1517/13543776.2016.1165209
93. Hayami S, Kelly JD, Cho HS, et al. Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers. *Int J Cancer.* 2011;128(3). doi:10.1002/ijc.25349
94. Serce N, Gnatzy A, Steiner S, Lorenzen H, Kirfel J, Buettner R. Elevated expression of LSD1 (Lysine-specific demethylase 1) during tumour progression from pre-invasive to invasive ductal carcinoma of the breast. *BMC Clin Pathol.* 2012;12. doi:10.1186/1472-6890-12-13
95. Shi Y, Lan F, Matson C, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* Published online 2004. doi:10.1016/j.cell.2004.12.012
96. Wang J, Telese F, Tan Y, et al. LSD1n is an H4K20 demethylase regulating memory formation via transcriptional elongation control. *Nat Neurosci.* 2015;18(9). doi:10.1038/nn.4069
97. Huang J, Sengupta R, Espejo AB, et al. p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature.* Published online 2007. doi:10.1038/nature06092

98. Tsai W-W, Nguyen TT, Shi Y, Barton MC. p53-Targeted LSD1 Functions in Repression of Chromatin Structure and Transcription In Vivo. *Mol Cell Biol*. Published online 2008. doi:10.1128/mcb.00287-08
99. Kontaki H, Talianidis I. Lysine Methylation Regulates E2F1-Induced Cell Death. *Mol Cell*. 2010;39(1). doi:10.1016/j.molcel.2010.06.006
100. Wang J, Hevi S, Kurash JK, et al. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet*. 2009;41(1). doi:10.1038/ng.268
101. Zheng YC, Ma J, Wang Z, et al. A Systematic Review of Histone Lysine-Specific Demethylase 1 and Its Inhibitors. *Med Res Rev*. 2015;35(5). doi:10.1002/med.21350
102. Chao A, Lin C-Y, Chao A-N, et al. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) destabilizes p62 and inhibits autophagy in gynecologic malignancies. *Oncotarget*. 2017;8(43):74434-74450. doi:10.18632/oncotarget.20158
103. Ambrosio S, Saccà CD, Amente S, Paladino S, Lania L, Majello B. Lysine-specific demethylase LSD1 regulates autophagy in neuroblastoma through SESN2-dependent pathway. *Oncogene*. 2017;36(48):6701-6711. doi:10.1038/onc.2017.267
104. Bitto A, Lerner CA, Nacarelli T, Crowe E, Torres C, Sell C. p62/SQSTM1 at the interface of aging, autophagy, and disease. *Age (Omaha)*. 2014;36(3). doi:10.1007/s11357-014-9626-3
105. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, et al. Autophagy Suppresses Tumorigenesis through Elimination of p62. *Cell*. 2009;137(6). doi:10.1016/j.cell.2009.03.048
106. Meijer AJ, Codogno P. Autophagy: Regulation and role in disease. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2009;46(4). doi:10.1080/10408360903044068
107. Harnett MM, Pineda MA, Latré de Laté P, et al. From Christian de Duve to Yoshinori Ohsumi: More to autophagy than just dining at home. *Biomed J*. 2017;40(1):9-22. doi:10.1016/j.bj.2016.12.004
108. Levine B. Eating oneself and uninvited guests: Autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell*. 2005;120(2). doi:10.1016/j.cell.2005.01.005
109. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. 2011;469(7330). doi:10.1038/nature09782
110. Li Y, Chen Y. AMPK and Autophagy. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 1206. ; 2019:85-108. doi:10.1007/978-981-15-0602-4_4

111. Pradel B, Robert-Hebmann V, Espert L. Regulation of Innate Immune Responses by Autophagy: A Goldmine for Viruses. *Front Immunol.* 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.578038
112. Morel E. La formation de l'autophagosome. *Medecine/Sciences.* 2017;33(3). doi:10.1051/medsci/20173303004
113. Abounit K, Scarabelli TM, McCauley RB. Autophagy in mammalian cells. *World J Biol Chem.* 2012;3(1). doi:10.4331/wjbc.v3.i1.1
114. Eisenberg-Lerner A, Kimchi A. The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy. *Apoptosis.* 2009;14(4). doi:10.1007/s10495-008-0307-5
115. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(9). doi:10.1038/nrm2239
116. Sehgal AR, Konig H, Johnson DE, et al. You eat what you are: Autophagy inhibition as a therapeutic strategy in leukemia. *Leukemia.* 2015;29(3). doi:10.1038/leu.2014.349
117. Santana-Codina N, Mancias JD, Kimmelman AC. The role of autophagy in cancer. *Annu Rev Cancer Biol.* 2017;1:19-39. doi:10.1146/annurev-cancerbio-041816-122338
118. Jiang P, Mizushima N. Autophagy and human diseases. *Cell Res.* 2014;24(1). doi:10.1038/cr.2013.161
119. Maiese K. Targeting molecules to medicine with mTOR, autophagy and neurodegenerative disorders. *Br J Clin Pharmacol.* Published online 2016. doi:10.1111/bcp.12804
120. Nikolettou V, Papandreou ME, Tavernarakis N. Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell Death Differ.* 2015;22(3). doi:10.1038/cdd.2014.204
121. Linton PJ, Gurney M, Sengstock D, Mentzer RM, Gottlieb RA. This old heart: Cardiac aging and autophagy. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;83. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.12.017
122. Harvey P a, Leinwand L a. The cell biology of disease: Cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J Cell Biol.* 2011;194(3). doi:10.1083/jcb.201101100
123. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011;13(2):132-141. doi:10.1038/ncb2152
124. Jung CH, Jun CB, Ro SH, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell.* 2009;20(7). doi:10.1091/mbc.E08-12-1249

125. Russell RC, Tian Y, Yuan H, et al. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol.* 2013;15(7):741-750. doi:10.1038/ncb2757
126. Zachari M, Ganley IG. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem.* 2017;61(6):585-596. doi:10.1042/EBC20170021
127. Shibutani ST, Yoshimori T. A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res.* 2014;24(1). doi:10.1038/cr.2013.159
128. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol.* 2005;171(4). doi:10.1083/jcb.200507002
129. Lan H, Tan M, Zhang Q, et al. LSD1 destabilizes FBXW7 and abrogates FBXW7 functions independent of its demethylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Published online 2019. doi:10.1073/pnas.1902012116
130. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* 2012;8(4). doi:10.4161/auto.19496
131. Huang R, Xu Y, Wan W, et al. Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation. *Mol Cell.* 2015;57(3). doi:10.1016/j.molcel.2014.12.013
132. Besteiro S. The role of host autophagy machinery in controlling Toxoplasma infection. *Virulence.* 2019;10(1):438-447. doi:10.1080/21505594.2018.1518102
133. Settembre C, Di Malta C, Polito VA, et al. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science (80-).* 2011;332(6036). doi:10.1126/science.1204592
134. Napolitano G, Esposito A, Choi H, et al. mTOR-dependent phosphorylation controls TFEB nuclear export. *Nat Commun.* 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-05862-6
135. Yang Q, Liu TT, Lin H, et al. TRIM32-TAX1BP1-dependent selective autophagic degradation of TRIF negatively regulates TLR3/4-mediated innate immune responses. *PLoS Pathog.* 2017;13(9). doi:10.1371/journal.ppat.1006600
136. Shojaei S, Suresh M, Klionsky DJ, Labouta HI, Ghavami S. Autophagy and SARS-CoV-2 infection: A possible smart targeting of the autophagy pathway. *Virulence.* 2020;11(1):805-810. doi:10.1080/21505594.2020.1780088
137. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell.* 2004;119(6). doi:10.1016/j.cell.2004.11.038

138. Zheng YT, Shahnazari S, Brech A, Lamark T, Johansen T, Brumell JH. The Adaptor Protein p62/SQSTM1 Targets Invading Bacteria to the Autophagy Pathway. *J Immunol.* 2009;183(9). doi:10.4049/jimmunol.0900441
139. Latré de Laté P, Pineda M, Harnett M, Harnett W, Besteiro S, Langsley G. Apicomplexan autophagy and modulation of autophagy in parasite-infected host cells. *Biomed J.* 2017;40(1):23-30. doi:10.1016/j.bj.2017.01.001
140. Nguyen HM, El Hajj H, El Hajj R, et al. *Toxoplasma gondii* autophagy-related protein ATG9 is crucial for the survival of parasites in their host. *Cell Microbiol.* 2017;19(6):e12712. doi:10.1111/cmi.12712
141. Gay G, Braun L, Brenier-Pinchart M-P, et al. *Toxoplasma gondii* TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN- γ -mediated host defenses. *J Exp Med.* 2016;213(9):1779-1798. doi:10.1084/jem.20160340
142. Real E, Rodrigues L, Cabal GG, et al. Plasmodium UIS3 sequesters host LC3 to avoid elimination by autophagy in hepatocytes. *Nat Microbiol.* 2017;3(1). doi:10.1038/s41564-017-0054-x
143. Yao Z, Klionsky DJ. Plasmodium protein UIS3 protects the parasite from autophagy clearance. *Autophagy.* 2018;14(8). doi:10.1080/15548627.2018.1483671
144. Ruivo MTG, Vera IM, Sales-Dias J, et al. Host AMPK Is a Modulator of Plasmodium Liver Infection. *Cell Rep.* 2016;16(10):2539-2545. doi:10.1016/j.celrep.2016.08.001
145. Hakimi M-A, Bougdour A. *Toxoplasma* 's ways of manipulating the host transcriptome via secreted effectors. *Curr Opin Microbiol.* 2015;26:24-31. doi:10.1016/j.mib.2015.04.003
146. Chen PB, Ding S, Zanghì G, et al. Plasmodium falciparum PfSET7: enzymatic characterization and cellular localization of a novel protein methyltransferase in sporozoite, liver and erythrocytic stage parasites. *Sci Rep.* 2016;6(1):21802. doi:10.1038/srep21802
147. Li J, Ahn JH, Wang GG. Understanding histone H3 lysine 36 methylation and its deregulation in disease. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(15). doi:10.1007/s00018-019-03144-y
148. Hahn MA, Wu X, Li AX, Hahn T, Pfeifer GP. Relationship between gene body DNA methylation and intragenic H3K9ME3 and H3K36ME3 chromatin marks. *PLoS One.* 2011;6(4). doi:10.1371/journal.pone.0018844

149. Ponts N, Fu L, Harris EY, et al. Genome-wide mapping of DNA methylation in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell Host Microbe*. 2013;14(6). doi:10.1016/j.chom.2013.11.007
150. Tolliday N, Clemons PA, Ferraiolo P, et al. Small molecules, big players: The National Cancer Institute's Initiative for Chemical Genetics. *Cancer Res*. 2006;66(18). doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2552
151. Hostettler I, Müller J, Hemphill A. In vitro screening of the open-source medicines for malaria venture malaria box reveals novel compounds with profound activities against *Theileria annulata* schizonts. *Antimicrob Agents Chemother*. Published online 2016. doi:10.1128/AAC.02801-15
152. Tataru Y, Lin YC, Bamba Y, Mori T, Uchida T. Dipentamethylene thiuram monosulfide is a novel inhibitor of Pin1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;384(3). doi:10.1016/j.bbrc.2009.04.144
153. Jang Y, Kim JE, Jeong SH, Paik MK, Kim JS, Cho MH. Trifloxystrobin-induced mitophagy through mitochondrial damage in human skin keratinocytes. *J Toxicol Sci*. 2016;41(6). doi:10.2131/jts.41.731
154. Jang Y, Lee AY, Chang SH, et al. Trifloxystrobin induces tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in HaCaT, human keratinocyte cells. *Drug Chem Toxicol*. 2017;40(1). doi:10.1080/01480545.2016.1174871
155. Binda C, Valente S, Romanenghi M, et al. Biochemical, structural, and biological evaluation of tranlycypromine derivatives as inhibitors of histone demethylases LSD1 and LSD2. *J Am Chem Soc*. 2010;132(19). doi:10.1021/ja101557k
156. Hostettler I, Müller J, Stephens CE, Haynes R, Hemphill A. A quantitative reverse-transcriptase PCR assay for the assessment of drug activities against intracellular *Theileria annulata* schizonts. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2014;4(3):201-209. doi:10.1016/J.IJPDDR.2014.09.003
157. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chemie - Int Ed*. 2001;40(11). doi:10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5
158. Gupta S, Ameta C, Ameta R, Punjabi PB. Click chemistry: A tool for green chemical organic synthesis. In: *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*. ; 2020:13-48. doi:10.1016/b978-0-12-819539-0.00002-6

159. Tyler DS, Vappiani J, Cañeque T, et al. Click chemistry enables preclinical evaluation of targeted epigenetic therapies. *Science* (80-). Published online 2017. doi:10.1126/science.aal2066
160. Lubas M, Harder LM, Kumsta C, et al. eIF 5A is required for autophagy by mediating ATG 3 translation . *EMBO Rep*. 2018;19(6). doi:10.15252/embr.201846072
161. Zhang H, Alsaleh G, Feltham J, et al. Polyamines Control eIF5A Hypusination, TFEB Translation, and Autophagy to Reverse B Cell Senescence. *Mol Cell*. 2019;76(1). doi:10.1016/j.molcel.2019.08.005
162. Bultot L, Jensen TE, Lai YC, et al. Benzimidazole derivative small-molecule 991 enhances AMPK activity and glucose uptake induced by AICAR or contraction in skeletal muscle. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2016;311(4). doi:10.1152/ajpendo.00237.2016
163. Kraft LJ, Dowler J, Manral P, Kenworthy AK. Size, organization, and dynamics of soluble SQSTM1 and LC3-SQSTM1 complexes in living cells. *Autophagy*. 2016;12(9). doi:10.1080/15548627.2016.1199299
164. Jung M, Choi H, Mun JY. The autophagy research in electron microscopy. *Appl Microsc*. 2019;49(1). doi:10.1186/s42649-019-0012-6
165. Govindaraju VK, Bodas M, Vij N. Cigarette smoke induced autophagy-impairment regulates AMD pathogenesis mechanisms in ARPE-19 cells. *PLoS One*. 2017;12(8). doi:10.1371/journal.pone.0182420
166. Kuo T-C, Chen C-T, Baron D, et al. Midbody accumulation through evasion of autophagy contributes to cellular reprogramming and tumorigenicity. *Nat Cell Biol*. 2011;13(10):1214-1223. doi:10.1038/ncb2332
167. Fioravanti R, Romanelli A, Mautone N, et al. Tranlycypromine-Based LSD1 Inhibitors: Structure-Activity Relationships, Antiproliferative Effects in Leukemia, and Gene Target Modulation. *ChemMedChem*. 2020;15(7). doi:10.1002/cmdc.201900730
168. King BC, Kulak K, Krus U, et al. Complement Component C3 Is Highly Expressed in Human Pancreatic Islets and Prevents β Cell Death via ATG16L1 Interaction and Autophagy Regulation. *Cell Metab*. 2019;29(1). doi:10.1016/j.cmet.2018.09.009
169. Jia H, Liang Z, Zhang X, Wang J, Xu W, Qian H. 14-3-3 proteins: An important regulator of autophagy in diseases. *Am J Transl Res*. 2017;9(11).
170. Chen M, Dai Y, Liu S, Fan Y, Ding Z, Li D. Tfeb biology and agonists at a glance. *Cells*. 2021;10(2). doi:10.3390/cells10020333

171. Rao X, Wang Y. Apolipoprotein A-I improves hepatic autophagy through the AMPK pathway. *Biochimie*. 2019;165. doi:10.1016/j.biochi.2019.08.001
172. Siddiqui R, Suzu S, Ueno M, et al. Apolipoprotein E is an HIV-1-inducible inhibitor of viral production and infectivity in macrophages. *PLoS Pathog*. 2018;14(11). doi:10.1371/journal.ppat.1007372
173. Zhang W, Zhang S, Guan W, et al. Poly C Binding Protein 1 Regulates p62/SQSTM1 mRNA Stability and Autophagic Degradation to Repress Tumor Progression. *Front Genet*. 2020;11. doi:10.3389/fgene.2020.00930
174. Decuypere J-P, Parys JB, Bultynck G. Regulation of the Autophagic Bcl-2/Beclin 1 Interaction. *Cells*. 2012;1(3). doi:10.3390/cells1030284
175. Jing K, Song KS, Shin S, et al. Docosahexaenoic acid induces autophagy through p53/AMPK/mTOR signaling and promotes apoptosis in human cancer cells harboring wild-type p53. *Autophagy*. 2011;7(11). doi:10.4161/auto.7.11.16658
176. Kim SM, Ha SE, Lee HJ, et al. Sinensetin induces autophagic cell death through p53-related ampk/mtor signaling in hepatocellular carcinoma hepg2 cells. *Nutrients*. 2020;12(8). doi:10.3390/nu12082462
177. Samora CP, Mogessie B, Conway L, Ross JL, Straube A, McAinsh AD. MAP4 and CLASP1 operate as a safety mechanism to maintain a stable spindle position in mitosis. *Nat Cell Biol*. 2011;13(9). doi:10.1038/ncb2297
178. Martella M, Catalanotto C, Talora C, Teana A La, Londei P, Benelli D. Inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5a (Eif5a) hypusination suppress p53 translation and alters the association of eif5a to the ribosomes. *Int J Mol Sci*. 2020;21(13). doi:10.3390/ijms21134583
179. Yun C, Lee S. The Roles of Autophagy in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3466. doi:10.3390/ijms19113466

« On ne fait jamais attention à ce qui a été fait ; on ne voit que ce qui reste à faire. »

Marie Curie
Physicienne, Scientifique (1867 - 1934)