

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE
Ecole Doctorale Biologie – Santé
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

N° d'ordre :

THESE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Discipline: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Julien LANCELOT

Le 13 décembre 2013

**Caractérisation des sirtuines de *Schistosoma mansoni*:
cibles thérapeutiques potentielles**

Devant le Jury composé de :

Président: **Professeur El Moukhtar ALIOUAT**

Rapporteurs: **Professeur Christoph GRUNAU**

Docteur Gerald SPAETH

Examineurs: **Docteur Martine DUTERQUE**

Docteur Christophe ROMIER

Docteur Raymond PIERCE

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille
Institut Pasteur de Lille - INSERM U1019 - CNRS UMR 8204 - Université Lille Nord de France
1 Rue du Professeur Calmette BP245 59019 Lille Cedex France

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr Camille Loch, directeur du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille pour m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse au sein de cette structure.

Je remercie particulièrement le Pr El Moukhtar Aliouat de me faire le plaisir de présider mon jury de thèse ainsi que le Pr Christoph Grunau et le Dr Gérald Spaeth pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de ce travail. Je remercie également les Drs Martine Duterque et Christophe Romier pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

Je remercie tout d'abord très sincèrement mon directeur de thèse, le Dr Raymond Pierce de m'avoir permis d'intégrer son équipe « Biologie Moléculaire du schistosome: Développement et Reproduction ». Ces quelques lignes ne seront pas suffisantes pour exprimer toute la reconnaissance que je vous porte pour m'avoir épaulé et conseillé tout au long de ces années. Je vous suis très reconnaissant du temps et de l'énergie que vous m'avez consacré pour me permettre de réaliser ce travail dans les meilleures conditions. Je vous remercie pour vos précieux conseils, votre expérience et votre gentillesse au quotidien. Pour finir, un grand merci pour m'avoir donné l'opportunité de participer à des congrès internationaux au cours desquels j'ai énormément appris.

Je tiens également à remercier le Dr Colette Dissous pour son expérience, ses conseils, son soutien et sa gentillesse. J'ai également appris beaucoup à vos côtés. J'ai apprécié nos nombreuses discussions scientifiques, nos débats - parfois enflammés - sur la politique, vos conseils culinaires et nos échanges au quotidien sur de nombreux sujets.

Je remercie l'ensemble des collaborateurs impliqué dans le projet SETReND et plus particulièrement le Pr Manfred Jung et le Dr Christophe Romier pour m'avoir accueilli quelques semaines au sein de leur unité ainsi que les Drs Mathias Schiedel et Martin Marek pour m'avoir encadré et conseillé pendant ces deux stages. Je remercie également le Dr Katia Cailliau pour la réalisation des manipulations en ovocyte de Xénope.

Je souhaite remercier infiniment Stéphanie Caby, ingénieur d'étude, pour sa patience, son encadrement, ses nombreux conseils tout au long de ces années passées au laboratoire. Sans toi, ton expérience et ta bonne humeur, la vie au laboratoire serait différente. Je te dois beaucoup, tu m'as formé à mes débuts, soutenu et motivé tout au long de ma thèse. J'ai beau chercher il n'y a pas de mot assez fort pour te dire à quel point je t'en suis reconnaissant.

J'adresse un remerciement chaleureux à Marion Morel, Nadège Gouignard et Mathieu Vanderstraete, mes collègues de paillasse – et avant tout mes amis - pour l'ensemble des moments formidables que nous avons vécu ensemble au laboratoire mais aussi en dehors. Je vous remercie pour votre aide au quotidien, vos nombreux conseils et votre soutien.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe 2 du CIIL, nos deux secrétaires Claudine Colson et Maria Houze qui font un travail remarquable au quotidien et plus généralement toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au cours de ma thèse.

Pour finir je remercie également, ma famille, mes amis, qui de près, comme de loin, m'ont soutenu tout au long de ce travail.

RESUME

La schistosomiase représente actuellement la seconde endémie parasitaire mondiale après le paludisme. Annuellement, cette pathologie est responsable de 280 000 décès et 700 millions d'individus y sont exposés dans 74 pays à travers le monde. Actuellement, le traitement de la schistosomiase repose sur l'utilisation d'un seul médicament, le Praziquantel®. Ainsi, le développement de nouveaux médicaments est devenu une priorité absolue pour l'OMS. Dans cette étude, notre objectif a été d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin de développer de nouveaux précurseurs de médicaments. Au cours de ce projet, nous avons focalisé nos recherches sur les enzymes impliquées dans la modification des histones et plus particulièrement sur les sirtuines, qui sont des lysines désacétylases NAD⁺ dépendantes.

Dans une première partie, nous avons caractérisé 5 orthologues de sirtuines de mammifères chez *Schistosoma mansoni* (SmSirt1, 2, 5, 6 et 7). De plus, nous avons étudié le potentiel des sirtuines comme cibles thérapeutiques pour le traitement de la schistosomiase en évaluant la toxicité d'inhibiteurs génériques de sirtuines humaines sur des parasites maintenus en culture. Ainsi, nous avons montré que les inhibiteurs de sirtuines humaines affectent *in vitro* la viabilité des schistosomules ainsi que la stabilité de l'accouplement et la production d'œufs des vers adultes. De plus, ces inhibiteurs induisent des changements morphologiques de l'appareil génital du ver femelle.

Dans une seconde partie, nous avons entrepris d'étudier plus spécifiquement le rôle de SmSirt2 en tant que cible thérapeutique. Ainsi, l'expression de la protéine recombinante en bactérie *E. coli* (collaboration: C. Romier, IGBMC, Illkirch) ainsi que l'optimisation d'un dosage fluorimétrique nous ont permis de montrer que SmSirt2 présente une activité lysine désacétylase *in vitro* (collaboration: M. Jung, Université Albert-Ludwigs, Freiburg). De plus, l'utilisation de ce dosage nous a permis de mettre en place le criblage à haut débit d'une chimiothèque de plus de 80 000 composés afin d'identifier de nouvelles molécules inhibitrices de l'enzyme SmSirt2 (collaboration: J. Schultz, Kancera AB, Stockholm). Les composés les plus prometteurs, ont été testés *in vitro* sur des parasites en culture. Les résultats obtenus démontrent que les inhibiteurs de SmSirt2 affectent également la viabilité des schistosomules ainsi que la stabilité de l'accouplement et la production d'œufs des vers adultes.

Dans une dernière partie, nous avons mis en place un criblage d'une banque d'ADNc de vers adultes par la technique du double hybride en levure dans le but d'identifier les partenaires protéiques de Sirt1 chez *S. mansoni*. L'analyse partielle des résultats nous a permis de mettre en évidence que SmSirt1 interagit avec plusieurs protéines impliquées dans la régulation des gènes chez le schistosome. Au cours de ce projet, nous avons également développé et optimisé un protocole permettant d'étudier l'activité enzymatique de SmSirt1 par injection d'ARNm dans des ovocytes de Xénope. Ainsi, nous avons pu montrer que le sirtinol et la salermide, deux inhibiteurs de Sirt1 humaine, présentent également une activité inhibitrice sur l'enzyme du parasite (collaboration: K. Cailliau, Université des Sciences et Technologies, Lille).

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce projet de thèse suggère que les sirtuines sont des cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement de la schistosomiase. Parmi les 5 orthologues identifiés chez *S. mansoni*, SmSirt2 semble une cible prometteuse. De plus, le criblage à haut débit que nous avons réalisé sur l'enzyme recombinante a permis d'identifier des molécules qui, après bio-optimisation, pourront être des candidats médicaments. Pour finir, ces résultats participent à une meilleure compréhension du rôle biologique des sirtuines chez *S. mansoni* et plus particulièrement sur leur implication dans la survie et la reproduction du parasite.

ABSTRACT

Schistosomiasis is the second most important parasitic disease worldwide after malaria. It is responsible for about 280 000 deaths annually and 700 million people in 74 countries are exposed to infection. Treatment of schistosomiasis currently depends on the use of the only available drug, praziquantel, and for this reason the development of new drugs is a strategic priority of the W.H.O. In this study, our objective was to identify novel therapeutic targets in order to develop new lead molecules for drug development. During this project we have focused our research on enzymes involved in histone modification, and more particularly on sirtuins, which are NAD⁺-dependent lysine deacetylases.

In the first part of the project, we have identified 5 homologues of mammalian sirtuins in *Schistosoma mansoni* (SmSirt1, 2, 5, 6 and 7). Moreover, we studied the potential of sirtuins as therapeutic targets for the treatment of schistosomiasis by evaluating the toxicity for parasites maintained in culture of generic inhibitors of human sirtuins. In this way we showed that these inhibitors affect the viability of schistosomula and the stability of pairing and egg production of adult worms. Moreover, these inhibitors caused major morphological changes, particularly to the female worm genital apparatus.

A second part of our work was devoted to the more detailed study of SmSirt2 as a therapeutic target. Immunisation of mice with the recombinant protein allowed us to obtain specific antibodies and to show that SmSirt2 protein is expressed at all parasite developmental stages. Furthermore, the use of the recombinant SmSirt2 expressed in *E. coli* (collaboration: C. Romier, IGBMC, Illkirch) and the optimization of a fluorimetric assay allowed us to show that SmSirt2 possesses a lysine deacetylase activity (collaboration: M. Jung, University Albert-Ludwigs, Freiburg). Moreover, the use of this assay allowed the setting up of a high-throughput screen (collaboration: J. Schultz, Kancera AB, Stockholm) of more than 80 000 compounds in order to identify novel inhibitors. The most promising candidates were tested on parasites in culture and the results obtained showed that SmSirt2 inhibitors also affect the viability of schistosomula, as well as the stability of pairing and egg production of adult worms.

In parallel, we have carried out screening of a yeast two-hybrid cDNA library in order to identify protein partners of Sirt1 in *S. mansoni*. The partial analysis of the results obtained shows that SmSirt1 interacts with several proteins involved in gene regulation. In the course of this project, using the enzyme expressed in *Xenopus* oocytes we were able to show that both sirtinol and salermide, inhibitors of human Sirt1, also inhibit the schistosome enzyme (Collaboration: K. Cailliau, University of Sciences and Technologies, Lille).

Taken together, the results of this thesis project suggest that sirtuins are potential therapeutic targets for the treatment of schistosomiasis. Of the five orthologues of human sirtuins identified in *S. mansoni*, SmSirt2 seems to be a promising target. Moreover, high-throughput screening using the recombinant enzyme identified inhibitors that, after bio-guided optimization, could be drug candidates. Finally, these results contribute to a better understanding of the biological role of *S. mansoni* sirtuins and in particular their importance in parasite survival and reproduction.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	1
CADRE DE TRAVAIL.....	2
INTRODUCTION.....	4
I Généralités - Schistosomiase.....	4
1. Découverte de la pathologie	4
2. Epidémiologie – Répartition géographique	5
3. Le cycle de vie du schistosome	6
3.1 De l'œuf à la larve infectante du vertébré	6
3.2 De la cercaire au développement de la pathologie.....	9
4. Physiopathologie et Diagnostic.....	11
5.1 Education des populations.....	14
5.2 Contrôle vectoriel.....	14
5.3 La chimiothérapie	15
5.4 La vaccination.....	17
II Généralités - Epigénétique.....	18
1. Un peu d'histoire... De la génétique à l'épigénétique	18
2. La structure de la chromatine.....	23
2.1 Le nucléosome	23
2.2 Les histones	24
2.3 Assemblage du nucléosome.....	25
2.4 Etats de condensation de la chromatine.....	27
3. Modifications de l'état de condensation de la chromatine.....	28
3.1 Les facteurs de remodelage de la chromatine.....	28
A. La famille SWI/SNF.....	29
B. La famille ISWI.....	31
C. La famille NURD/Mi2/CHD.....	32
D. La famille INO80	33
3.2 Les variants d'histones	34
A. Les variants de l'histone H2A.....	34
B. Les variants de l'histone H3.....	36

• Le variant CENP-A	36
• Les variants H3.1 et H3.2 et H3.3	37
3.3 Les modifications post-traductionnelles des histones	37
A. La méthylation des histones.....	40
B. La phosphorylation des histones.....	42
C. L'ubiquitinylation des histones	43
4. Acétylation/Désacétylation des histones.....	45
4.1 L'acétylation des histones.....	45
A. La famille GNAT (GCN5-related N-Acetyl Transferase).....	46
B. La famille p300/CBP	47
C. La famille MYST	48
4.2 La désacétylation des histones.....	50
A. Les HDAC(s) de classe I.....	51
B. Les HDAC(s) de classe II.....	52
C. Les HDAC(s) de classe IV	54
5. Les HDAC(s) NAD-dépendantes – Les Sirtuines.....	54
5.1 Classification des HDAC(s) de classe III	55
5.2 Structure des Sirtuines	56
5.3 Mécanisme d'action	58
5.4 Localisation cellulaire et fonctions biologiques	59
5.5 Régulation de l'activité des sirtuines.....	66
A. Les activateurs de sirtuines.....	66
B. Les inhibiteurs de sirtuines.....	69
III Epigénétique et Schistosome	72
OBJECTIF DE L'ETUDE	75
RESULTATS	77
Partie 1: Caractérisation des sirtuines de <i>Schistosoma mansoni</i> :	
Ciblesthérapeutiques potentielle	77
Partie 2: Etude du rôle potentiel de SmSirt2 comme cible thérapeutique dans le traitement de la schistosomiase et développement d'inhibiteurs.....	80
I Introduction	80
II Matériels et Méthodes.....	82
III Résultats.....	88
IV Discussion	98

Partie 3: Identification des partenaires protéiques de SmSirt1 et mise au point d'un dosage enzymatique en ovocytes de xénope	102
I Introduction	102
II Matériels et Méthodes.....	104
Tableau 1: Liste des oligonucléotides utilisés	108
III Résultats	108
IV Discussion	113
DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES	116
BIBLIOGRAPHIE.....	127

LISTE DES ABREVIATIONS

ACF: ATP-utilizing Chromatin remodeling and assembly Factor	MEF2: Myocyte Enhancer Factor 2
ANP32: Acidic Nuclear Phosphoprotein 32	MORF: MOZ-Related Factor
ARNi: ARN interference	MOZ: Monocytic leukaemia Zinc-finger protein
Arp: Actin-Related Proteins	MYST: MOZ Ybf2/Sas3 Sas2 Tip60
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated	NAM: Nicotinamide
BAF: Brg1 Associated Factors	N-CoR: Nuclear Receptor Co-Repressor
BRG1: Brahma-Related Gene 1	NAD⁺: Nicotinamide Adénine Dinucléotide
BRM: Brahma	NF-κB: Nuclear Factor Kappa B
CAF-1: Chromatin Assembly Factor 1	NoRC: Nucleolar Remodeling Complex
CBP: CREB-Binding Protein	NuA4: Nucleosome Acetyltransferase of Histone 4
CENP-A: Centromere Protein A	NURF: Nucleosome Remodeling Factor
CHD: Chromodomain-Helicase-DNA-binding	OAADPr: 2'-O-acetyl-ADP-ribose
ChD: Chromadomain	OMS: Organisation Mondiale de la Santé
ChIP: Chromatin Immunoprecipitation	ORC: Origin Recognition Complex
CHRAC: Chromatin Remodeling and Assembly Complex	P/CAF: p300/CBP-Associated Factor
CK2: Casein Kinase 2	PAD: Protein Arginine Deaminases
CPS1: Carbamoyl Phosphate Synthetase 1	PBAF: Polybromo-associated BAF
DALYs: Disability Adjusted Life Years	PG: Progesterone
DBC1: Deleted in Bladder Cancer 1	PHD: Plant Homeo Domain
DUB: Deubiquitinating enzymes	PKA: Protein Kinase A
FAD: Flavin Adenine Dinucleotide	PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
FoxO: Forkhead box O	PRMT: Protein arginine Metyltransferases
GNAT: GCN5-related N-Acetyl Transferase	PZQ: Praziquantel
GVBD: Germinal Vesicle BreakDown	RING1: Ring finger protein 1
HAT: Histone Acetyl Transferase	RSC: Remodeling the Structure of Chromatin
HBO1: Histone acetyltransferase Bound to ORC	RSF: Remodeling and Spacing Factor
HDAC: Histone Désacétylase	SAGA: Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase
HIRA: Histone Regulator A	SANT: Swi3 Ada2 N-CoR TFIIIB
HME: Histone Modify Enzyme	SET: Suppressor of variegation, Enhancer of zeste, Trithorax
HMT: Histone Metyltransférase	SMC3: Structural Maintenance of Chromosome 3
HSA: Helicase-SANT-Associated	SNF2: Sucrose Non Fermenting 2
Hsp: Heat shock <i>proteins</i>	Sir2: Silence information regulator 2
ING5: Inhibitor of Growth protein 5	Sirt: Sirtuine
INO80: Inositol auxotroph 80	SLIDE: SANT-like ISWI
ISWI: Imitation switch	STAC: Sirtuin-Activating Compound
JHDM: Jumonji Histone Demethylases	SWI: mating-type Switching
LRR: Leucine - Rich Repeat	Tip60: HIV Tat-interactive protein, 60kDa
LSD1: Lysine Specific Demethylase1	TNF-α: Tumor Necrosis Factor Alpha
MBD: Methyl-CpG-Binding Domain	TSP2: Tétraspamine 2
MDM2: Mouse Double Minute 2	TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling
	WCRF: Williams syndrome Chromatin Remodeling Factors

CADRE DE TRAVAIL

Laboratoire d'accueil:

Ce projet de recherche a été réalisé à l'Institut Pasteur de Lille au sein, du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), unité UMR 8204 - INSERM U1019, dirigée par le Dr Camille Locht. Ce travail a été effectué sous la direction du Dr. Raymond Pierce responsable de l'équipe « Biologie moléculaire du développement et de la reproduction du schistosome ».

Le CIIL est une structure qui a été fondée en 2008 et qui regroupe 11 équipes de recherche ainsi qu'une plateforme technique de transcriptomique et de génomique. Les axes majeurs de recherche sont orientés sur la biologie des pathogènes, les stratégies d'infection ainsi que sur les processus inflammatoires et la réponse de l'hôte. Les pathologies ciblées par les différentes équipes de recherche sont nombreuses et variées: hépatite C, tuberculose, malaria, peste, coqueluche, toxoplasmose, infections fongiques, respiratoires et gastro-intestinales. Dans ce contexte, notre équipe s'intéresse aux mécanismes biologiques impliqués dans le développement et la reproduction du schistosome, un parasite plathelminthe responsable de la schistosomiase. Ainsi, notre groupe se focalise depuis plusieurs années sur les mécanismes impliqués dans la régulation et le contrôle de l'expression des gènes chez *Schistosoma mansoni*. Ces trois dernières années, dans le cadre du projet SETReND, financé par la Commission Européenne, nos recherches ont porté plus précisément sur les enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles des histones.

Collaborations:

Dr Christophe Romier, IGBMC, Département de Biologie Intégrative, Inserm U964, CNRS UMR 1704, Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France

Production de protéine recombinante – Cristallographie

Pr Manfred Jung, Institute of Pharmaceutical Sciences, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 79104 Freiburg, Germany

Synthèse d'inhibiteurs de sirtuines – Dosage enzymatiques

Pr Wolfgang Sippl, Department of Pharmaceutical Chemistry, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 06120 Halle, Germany

Modélisation – Criblage in silico et Synthèse d'inhibiteurs de sirtuines

Dr Johan Schultz, Kancera AB, Karolinska Institutet Science Park, 17148 Solna, Sweden

Criblage à haut débit sur l'enzyme SmSirt2

Dr Katia Cailliau-Maggio, Université des sciences et techniques de lille, EA4479, IFR147, 59491 Villeneuve d'Ascq, France

Manipulation biologique du modèle Ovocyte de Xenopus laevis – Co-immunoprécipitations – Mise en place d'un dosage de l'activité enzymatique de Sirt1

Financements:

Ce projet de recherche a été financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Les stages effectués dans les équipes du Dr Christophe Romier et du Pr Manfred Jung ont été supportés par la Commission Européenne (Projet SEtTReND - FP7).

INTRODUCTION

I Généralités - Schistosomiase

1. Découverte de la pathologie

La première description de la schistosomiase est très ancienne et remonte à 1550 avant J.C. Sur des papyrus découverts à Louxor, on peut interpréter que les égyptiens faisaient déjà état à cette époque, d'une maladie caractérisée par une hématurie. Cette interprétation sera confirmée par la suite par la découverte d'œufs calcinés de schistosomes dans le cortex rénal de momies égyptiennes. Au Moyen Âge, la présence de sang dans les urines a également été observée par des médecins portugais et espagnols dans des zones qui sont actuellement endémiques pour la schistosomiase. Des chirurgiens français accompagnant Napoléon Bonaparte lors de sa campagne en Egypte vont également faire le même constat.

Il faudra attendre 1852 pour que le docteur Théodore Bilharz mette en évidence, lors d'une autopsie, la présence de petits vers blancs dans les veines mésentériques d'un égyptien qu'il va relier à la présence d'œufs détectés dans les urines du patient. Il dénomme ce ver *Distomum haematobium* qui sera par la suite, appelé *Schistosoma haematobium*. La schistosomiase est également appelée bilharziose de par le nom de son découvreur.

En 1902, P. Manson remarque la présence d'œufs de schistosome lors d'un examen de selles. Cependant, la morphologie des œufs est différente de celle décrite par Bilharz puisque les œufs présentent un éperon latéral caractéristique [Manson, 1902]. Il défend ainsi l'hypothèse qu'il existe différentes espèces de schistosomes dont certaines sont responsables d'une forme intestinale et d'autres d'une forme urinaire de la schistosomiase. En 1907, Sambon confirme cette hypothèse et nomme cette deuxième espèce, *Schistosoma mansoni*. A la suite de ces découvertes, d'autres espèces de schistosomes capables d'infecter l'homme vont être identifiées: *Schistosoma japonicum* a été décrite pour la première fois au Japon par Katsurada en 1904 [Tanaka et Tsuji, 1997], *Schistosoma intercalatum* a été isolée en 1934 au Congo par Fisher alors que *Schistosoma mekongi* a été découverte plus tardivement au Laos en 1978 [Ohmae et al., 2004]. Plus récemment, une nouvelle espèce, *Schistosoma guineensis* a été caractérisée en 2003 en République démocratique du Congo. A ce jour, 21 espèces de schistosomes ont été répertoriées dont six sont capables d'infecter l'homme [Webster et al., 2006].

2. Epidémiologie – Répartition géographique

En 2013, la schistosomiase représente la seconde endémie parasitaire mondiale après le paludisme. Cette pathologie est responsable de 280 000 décès annuellement et 700 millions d'individus y sont exposés dans 74 pays à travers le monde (Fig 1). On estime que 207 millions d'individus sont infectés par la schistosomiase et que 90 % des cas sont localisés en Afrique sub-saharienne et plus particulièrement au Nigéria, en Tanzanie, en République démocratique du Congo et au Ghana [Steinmann *et al.*, 2006]. L'espèce *S. haematobium* représente en Afrique deux tiers du nombre de cas de schistosomiase dans le monde alors que *S. mansoni* est responsable d'environ un tiers des cas. L'espèce *S. mansoni* est également retrouvée localisée en Amérique latine et plus particulièrement au Brésil alors que les espèces *S. japonicum* et *S. mekongi* sont responsables de plus d'un million de cas de schistosomiase en Asie. Ces données épidémiologiques sont généralement considérées comme sous estimées car dans certains pays endémiques, aucune étude épidémiologique n'a été mise en place.

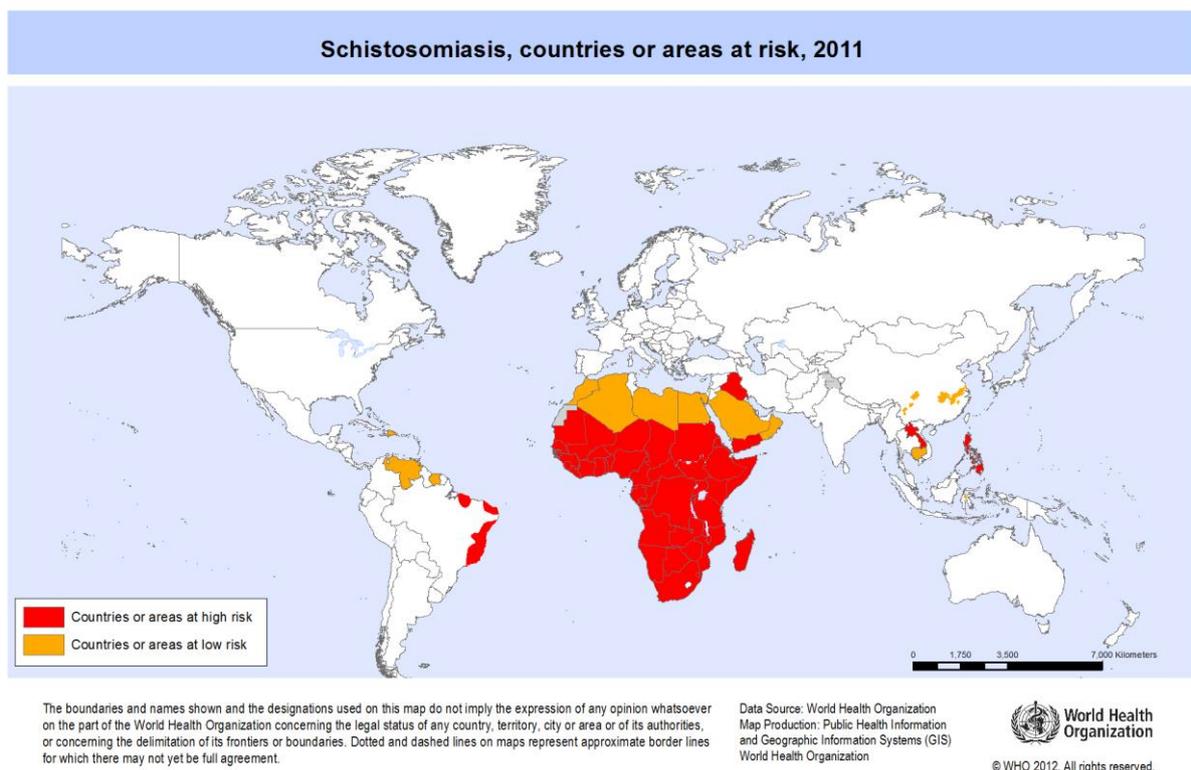


Figure 1: Distribution géographique de la schistosomiase dans le monde en 2011. Les pays à haut risque infectieux (en rouge) et les pays à faible risque infectieux (Orange) [OMS 2012].

3. Le cycle de vie du schistosome

La schistosomiase est une pathologie chronique due à un ver plat du genre *Schistosoma*. Les schistosomes sont des trématodes à sexes séparés, hémato-phages et vivant dans le système circulatoire de leur hôte. Ils présentent un cycle de vie complexe avec cinq stades de développement qui sont morphologiquement différents. Les schistosomes appartiennent à la sous classe des digènes car ils sont capables d'infester successivement un hôte intermédiaire, un mollusque gastéropode d'eau douce et un hôte définitif qui est un vertébré. Le cycle de vie du schistosome est caractérisé par une phase de reproduction asexuée au sein du mollusque, alternée avec une phase de reproduction sexuée au sein de son hôte définitif (Fig 2).

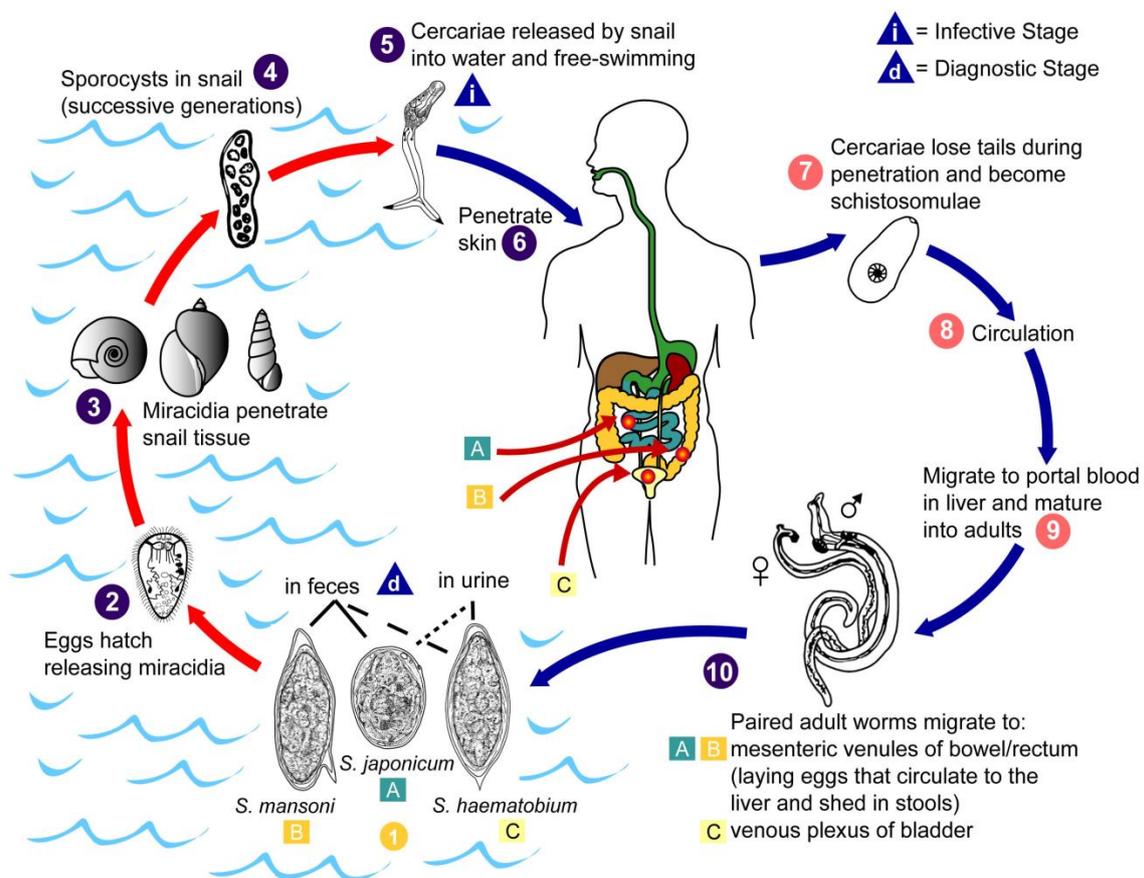


Figure 2: Les différentes étapes du cycle de vie du schistosome. L'hôte intermédiaire est un mollusque d'eau douce et l'hôte définitif un vertébré [CDC: Center for Disease Control and Prevention]

3.1 De l'œuf à la larve infectante du vertébré

Le premier stade de développement dans le cycle de vie du schistosome est l'œuf. Comme nous l'avons vu au début de cette introduction, les œufs présentent une morphologie différente en fonction de l'espèce de schistosome considérée (Fig 3). En effet, les œufs de *S. japonicum* et de *S. mekongi* ont une forme arrondie, ne présentent pas

d'éperon à leur surface et sont de taille plus petite que les trois autres espèces connues pour infecter l'homme. Les œufs de *S. haematobium* ont une forme ovoïde et présentent un éperon terminal réduit. Pour finir, les œufs de *S. intercalatum* ont une forme allongée et un éperon terminal alors que ceux de *S. mansoni* sont caractérisés par une forme ovoïde et la présence d'un éperon latéral.

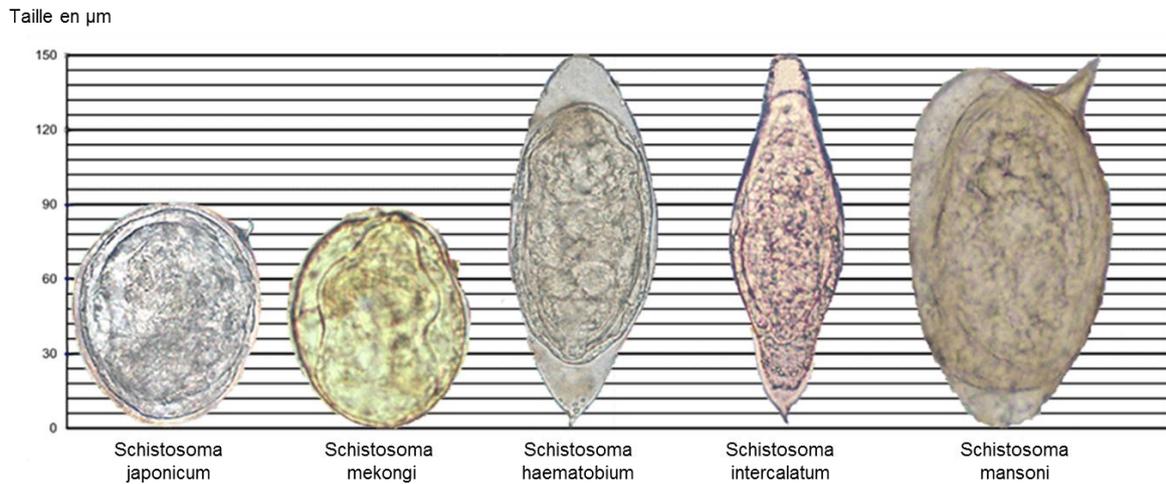


Figure 3: Morphologie d'œuf de différentes espèces de schistosomes. De gauche à droite: œufs de l'espèce *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. haematobium*, *S. intercalatum* et *S. mansoni* [D'après CDC: Center for Disease Control and Prevention].

Les œufs de schistosomes contiennent une larve appelée le miracidium (Fig 4A). Au contact d'une eau douce et dans des conditions de température et de luminosité favorables, les œufs éclosent pour libérer le miracidium. Cette larve nageuse de 150 à 180 nm de longueur possède 4 couches épidermiques recouvertes par de nombreux cils lui permettant de se déplacer dans l'eau. Libéré de l'œuf, le miracidium part à la recherche de son hôte, un mollusque d'eau douce, il est infectieux pendant 8 à 12 heures. Chaque espèce de schistosome présente une spécificité pour un genre de mollusque (Fig 4B). Ainsi, les miracidiums de *S. mansoni* vont infecter des mollusques du genre *Biomphalaria*, ceux de *S. haematobium* et de *S. intercalatum* des mollusques du genre *Bulinus* alors que les miracidiums de *S. japonicum* vont infester des mollusques du genre *Oncomelania*. Pour finir, les miracidiums de *S. mekongi* infestent des mollusques du genre *Neotricula*. Cette spécificité d'espèce des miracidiums vis-à-vis de l'hôte intermédiaire va régir en partie la distribution géographique des différentes espèces de schistosomes dans le monde.

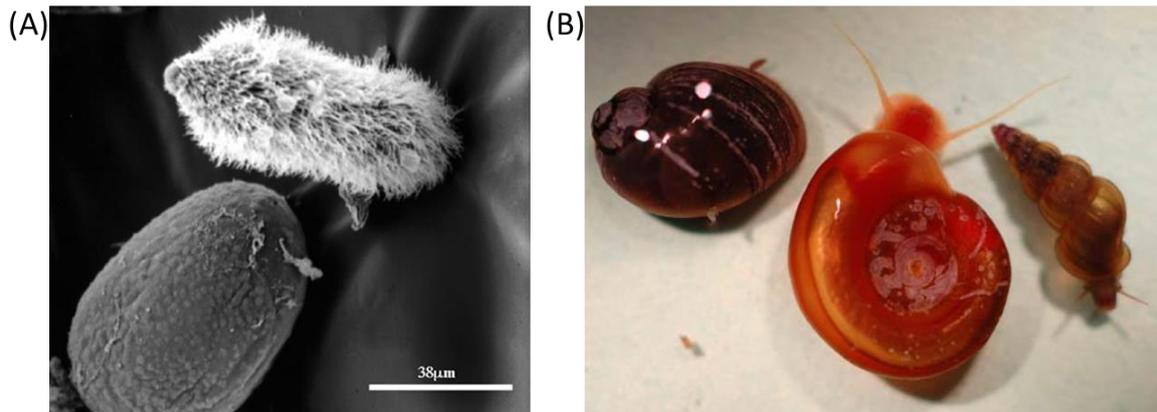


Figure 4: Le miracidium: larve infestante de l'hôte intermédiaire. (A) Image d'un miracidium vu par microscopie électronique à balayage. (B) Hôte intermédiaire, un mollusque d'eau douce spécifique de chaque espèce de Schistosome. De gauche à droite: Mollusques du genre *Bulinus*, *Biomphalaria* et *Oncomelania* [Lewis et al., 2008].

Dans 70% des cas, le miracidium s'introduit dans le mollusque par son pied. Grâce aux enzymes présentes dans ses glandes apicales et latérales, le miracidium lyse les cellules épidermiques du mollusque puis s'attaque aux tissus sous-épidermiques pour rejoindre l'hémolymphe. Après sa pénétration au sein du mollusque, le miracidium subit une transformation de son tégument et évolue en sporocyste primaire. En fonction de l'espèce de schistosome considérée, le sporocyste se développe à différents endroits au sein du mollusque. Ainsi, les sporocystes de *S. mansoni* et *S. haematobium* se développent à proximité du site de pénétration alors que les sporocystes de *S. japonicum* auront tendance à se développer plus profondément dans le mollusque et à proximité des organes creux.

Au sein du sporocyste se déroule une phase de reproduction asexuée au cours de laquelle les cellules germinales se divisent pour donner naissance, après quelques semaines, à 2 ou 3 générations successives de sporocystes secondaires. Ensuite, les sporocystes secondaires migrent vers l'hépatopancréas et les gonades du mollusque soit de manière passive dans le système circulatoire, soit de manière active à travers les tissus cognitifs lâches. A proximité de ces organes, un nouveau cycle de division des cellules germinales des sporocystes secondaires suivi d'une différenciation aboutit à la formation de cercaires, la larve infestante pour l'hôte définitif, un vertébré. On estime que 3 à 8 semaines après l'infestation d'un mollusque, un miracidium peut donner naissance à plusieurs milliers de cercaires. Les cercaires sont constituées d'un corps cercarien prolongé par une queue avec une extrémité en forme de fourche lui permettant de se déplacer dans un milieu aqueux.

3.2 De la cercaire au développement de la pathologie

Arrivées à maturité, les cercaires s'échappent du mollusque pour se retrouver dans l'eau où elles vont nager activement à la recherche de leur hôte définitif. Après une première phase de contact avec la peau, les cercaires pénètrent la barrière épidermique de leur hôte définitif grâce à une attaque protéolytique de la peau, associée à des contractions violentes de leur queue [Salter *et al.*, 2000]. La phase de pénétration des cercaires au travers de la peau s'accompagne d'une perte de leur queue et d'un changement de leur tégument. De plus, les cercaires perdent leur glycocalyx afin d'échapper à la réponse immune de l'hôte définitif. Cette transformation va aboutir à un nouveau stade larvaire du schistosome que l'on nomme le schistosomule. Après une durée de 2 à 4 jours dans la peau, les schistosomules traversent l'épiderme de leur hôte pour rejoindre la circulation sanguine qui va les transporter jusque dans les capillaires pulmonaires. [Wilson *et al.*, 1978]. Il a également été démontré qu'un certain nombre de schistosomules empruntaient également les vaisseaux lymphatiques pour se retrouver au niveau des poumons [Wheater et Wilson, 1979]. Au niveau des capillaires pulmonaires, les schistosomules vont entrer dans une première phase de maturation au cours de laquelle ils vont s'affiner pour pouvoir progresser dans les capillaires et modifier leur tégument dans le but d'échapper plus facilement au système immunitaire de leur hôte. Après un passage dans les poumons de 3 à 4 jours, les schistosomules retournent dans la circulation systémique pour atteindre le système porte hépatique environ 15 jours après l'infestation. Au niveau du foie, les schistosomules vont entrer dans une deuxième phase de maturation où ils vont subir une croissance intense aboutissant à la formation de vers adultes, sexuellement matures après 30 jours d'infestation.

Les vers adultes mâles et femelles sont facilement identifiables car ils présentent une morphologie différente. En effet, alors que les vers mâles sont plats, trapus et de taille allant de 6 à 13 mm de longueur, les femelles sont rondes, fines et ont une taille supérieure allant de 10 à 20 mm de longueur (Fig 5B). Les vers adultes vivent en accouplement permanent au sein de l'organisme de leur hôte définitif. Le ver adulte mâle présente un canal gynécophore où la femelle vient se loger (Fig 5A, 5C). Les couples vont ensuite migrer à contre-courant de la circulation sanguine pour aller se loger au niveau du plexus vésical à proximité de la vessie pour l'espèce *S. haematobium* et au niveau des veines mésentériques à proximité du tube digestif pour les autres espèces.

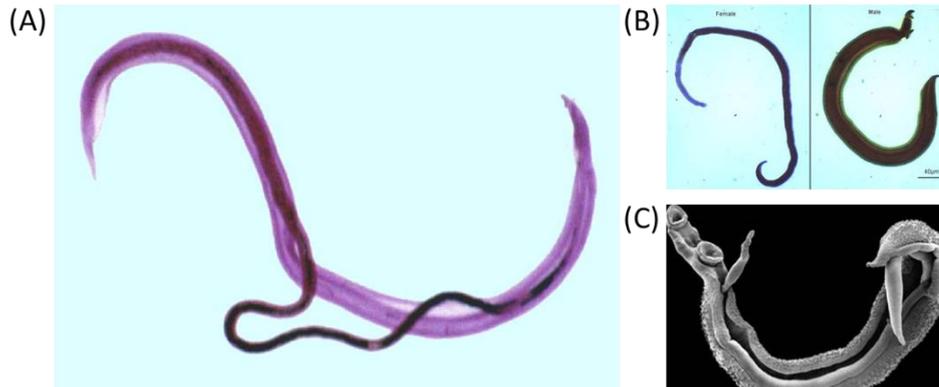


Figure 5: Couples de vers adultes de *S. mansoni*. (A) Image colorée d'un couple de schistosomes prise au microscope: la femelle, de couleur plus foncée se loge dans le canal gynécophore du ver mâle. (B) Morphologie d'une femelle adulte de schistosome à gauche et d'un mâle à droite. (C) Image d'un couple de schistosomes prise au microscope électronique à balayage.

Environ 5 semaines après l'infestation et après fécondation, la femelle commence à pondre de nombreux œufs. En effet, on estime qu'une femelle peut pondre quotidiennement 300 œufs pour les espèces *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. intercalatum* et jusqu'à plusieurs milliers pour les espèces *S. japonicum* et *S. mekongi*. Une partie des œufs pondus va être entraînée par le flux sanguin jusque dans les capillaires des organes les plus proches: la vessie pour les œufs de *S. haematobium*, le foie et l'intestin pour les autres espèces de schistosomes. Bloqués dans les tissus, les œufs sont à l'origine de la pathologie en provoquant une réaction inflammatoire intense aboutissant à la formation de granulomes bilharziens caractéristiques de la bilharziose (Fig 6A et 6B). Ces granulomes sont composés de cellules épithélioïdes et de nombreuses cellules immunitaires comme les macrophages, les éosinophiles et les lymphocytes. Par la suite, ce granulome évolue en fibrose aboutissant à une obstruction des capillaires qui est à l'origine d'une hypertension portale entraînant une hépato-splénomégalie également caractéristique de la schistosomiase (Fig 6C).

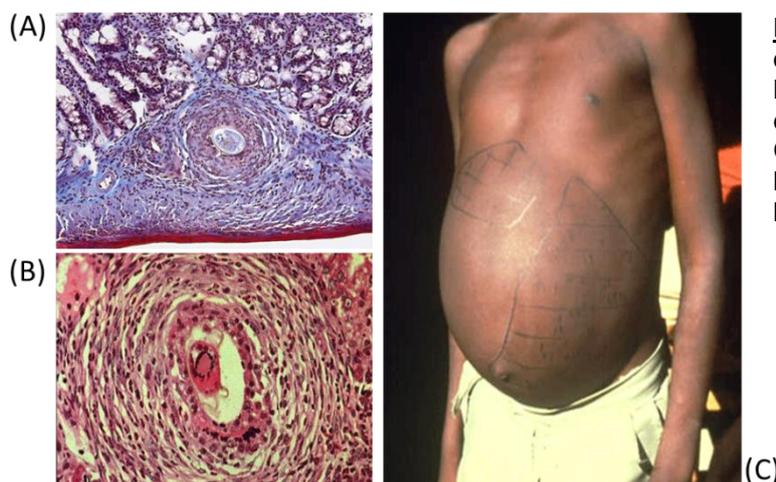


Figure 6: La présence des œufs dans les tissus est responsable de la pathologie. (A) Coloration d'une coupe de granulome intestinal. (B) Coloration d'une coupe de granulome hépatique. (C) Individu atteint d'une hépato-splénomégalie.

L'autre partie des œufs pondus par la femelle schistosome à proximité de la lumière intestinale ou uro-génitale, va traverser la paroi de ces organes creux pour être évacuée à l'extérieur de l'organisme dans les selles et l'urine afin de permettre la continuité du cycle de développement du schistosome.

4. Physiopathologie et Diagnostic

D'un point de vue clinique, on distingue plusieurs phases dans l'évolution de la pathologie chez l'homme. La première, la phase d'invasion correspond à la pénétration des cercaires au sein de leur hôte. Cette phase passe souvent inaperçue mais peut être caractérisée, 15 à 30 minutes après le bain infestant, par l'apparition d'un érythème cutané allergique plus communément appelé la dermatite du nageur. Cette dermatite est plus importante pour les espèces *S. japonicum* et *S. mekongi* et s'accompagne, lors de la migration des schistosomules dans l'organisme, de fièvre nocturne, de céphalées, de myalgie et de douleurs abdominales. Ces différents symptômes apparaissent entre 14 et 84 jours après une première infestation et sont caractéristiques du syndrome de Katayama [Ross *et al.*, 2007]

La deuxième phase de développement de la pathologie correspond à une phase toxémique due à la migration et à la maturation des schistosomules dans la circulation sanguine. Cette phase clinique est marquée par un malaise général caractérisé par une asthénie, de la fièvre, des maux de tête et une anorexie qui sont bien souvent accompagnées de troubles anaphylactiques tels que l'apparition d'un prurit, d'une arthralgie, d'une myalgie et de poussées d'urticaire.

La troisième phase est une phase d'état correspondant à la ponte des œufs dans l'organisme par les vers femelles de schistosome. Dans le cas d'une bilharziose uro-génitale, cette phase est caractérisée par l'apparition de sang dans les urines s'accompagnant généralement de signes d'irritation vésicale comme des douleurs mictionnelles pouvant se propager aux bourses ainsi qu'au périnée. Dans certains cas, ce sont des crises de coliques néphrétiques qui vont orienter le diagnostic. Dans le cas d'une bilharziose intestinale, le symptôme caractéristique est une perturbation du transit où l'individu alterne entre des crises diarrhéiques d'intensités variables et des périodes de constipation accompagnées de ballonnements et de douleurs coliques. La présence de sang dans les selles est également un symptôme caractéristique de la bilharziose intestinale.

Pour finir, la dernière phase de développement de la pathologie est une phase de complications qui correspond à la rétention des œufs dans les tissus de l'organisme. Dans le

cas d'une bilharziose uro-génitale, on note une atteinte sévère de l'arbre urinaire ainsi que du système génital avec, entre autres, l'apparition de fistules urétrales, d'utérohydronéphrose, d'urétrite, de prostatite, d'endométrite et de vaginite. L'ensemble de ces complications favorise bien souvent le développement de cancer de la vessie [Zaghloul, 2012] et facilite la pénétration de pathogènes transmis sexuellement tel que le HIV (Human Immunodeficiency Virus) [Secor, 2012]. Dans le cas d'une bilharziose intestinale, les complications sont caractérisées par une hépto-splénomégalie aboutissant, dans les formes les plus sévères de la pathologie, à une hypertension portale. Dans des cas plus rares, les parasites peuvent présenter une localisation cardio-vasculaire, neurologique et/ou cutanée pouvant entraîner des myélites transverses, une paraplégie et/ou des lésions papulonodulaires.

En plus de ces différents aspects de la pathologie associés à l'infestation par les schistosomes, d'autres effets de la maladie contribuent à son impact sur les populations affectées. Dans une méta-analyse des rapports scientifiques qui concernent la morbidité induite par la schistosomiase, les auteurs ont mis en évidence l'association de la maladie avec l'anémie, la douleur chronique, l'intolérance à l'exercice, la sous-nutrition, un retard de croissance et une diminution des capacités d'apprentissage [King *et al.*, 2005]. L'impact des maladies sur les populations est mesuré par l'estimation des années de vie en bonne santé perdues à cause de la morbidité et de la mortalité qu'elles provoquent: les DALYs (Disability Adjusted Life Years). L'OMS a attribué un « poids d'handicap » (*disability weight*) de 0,5% à la schistosomiase, mais les travaux de King *et al.* ont permis de corriger ce poids pour l'estimer entre 2 et 15%. De ce fait, les DALYs perdus, attribuables à la schistosomiase, s'élèvent à 24 millions au minimum [King, 2010], plaçant cette maladie au deuxième rang des parasitoses, derrière le paludisme.

Les méthodes de diagnostic utilisées sont différentes au cours du cycle de développement du schistosome dans l'organisme. En effet, pendant les phases d'invasion et de croissance du parasite, qui correspondent à la pénétration des cercaires puis à la migration des schistosomules dans la circulation sanguine, on observe, chez l'individu infesté, une hyper-éosinophilie importante ainsi qu'une réaction sérologique rapidement positive. Pendant la phase de maturation, les œufs pondus par la femelle schistosome sont mis directement en évidence dans les selles, les urines et parfois dans les biopsies de granulomes.

Au cours des phases d'invasion et de croissance, la bilharziose est fréquemment asymptomatique et par conséquent difficile à diagnostiquer. Cependant, au cours de ces deux phases, l'éosinophilie est importante surtout pour les espèces *S. mansoni*, *S. mekongi*

et *S. japonicum* avec un taux de polynucléaires éosinophiles allant de 40 à 70 %. A partir de la phase d'état où les femelles commencent à pondre, ce taux diminue et est aux environs de 10 à 20 %. Les techniques sérologiques pour le diagnostic de la bilharziose sont sensibles et utilisent, quasiment toutes, des antigènes extraits de *S. mansoni*. Parmi ces techniques, l'immunofluorescence indirecte et le test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) sont aujourd'hui les plus utilisées car elles présentent une sensibilité et une spécificité importante. L'immunoélectrophorèse, est la technique de diffusion en milieu gélifié la plus utilisée pour le diagnostic sérologique de la bilharziose. La réaction antigène-anticorps est mise en évidence par l'apparition d'arcs de précipitation révélés après coloration. A l'inverse, les techniques nécessitant des antigènes vivants, telles que la réaction de Vogel-Minning qui utilise des cercaires [Pifano et Ron Pedrique, 1959] et celle d'Olivier Gonzales [Kagan et Oliver-Gonzales, 1958] qui utilise des œufs de schistosome, sont de moins en moins, voire quasiment plus utilisées car elles nécessitent l'entretien de souches parasitaires au laboratoire.

Pendant la phase de maturation, le diagnostic est orienté par la mise en évidence de la présence des œufs dans les selles, les urines ou les biopsies. La détection des œufs apporte la preuve indiscutable de la parasitose mais peut être difficile à mettre en évidence notamment lors d'une infestation modérée. Dans le cas d'une bilharziose urinaire, la détection des œufs de *S. haematobium* s'effectue par un examen du culot sédimentaire des urines de 24 heures ou par une filtration des urines sur une membrane en polycarbonate. La filtration des urines permet une évaluation quantitative du nombre d'œuf. Chez les enfants, l'hématurie est caractéristique d'une infestation par *S. haematobium*. Cette dernière est mise en évidence à l'aide d'une analyse au microscope d'un échantillon d'urine ou à l'aide de bandelettes réactives.

Dans le cas d'une bilharziose intestinale, la recherche des œufs s'effectue au cours d'un examen de selles. La technique de Kato-Katz [Katz *et al.*, 1970] est la plus utilisée à ce jour et permet, par l'examen sous microscope d'un prélèvement de matière fécale d'estimer l'intensité de l'infestation, car celle-ci est proportionnelle au nombre d'œufs trouvés par gramme de selle.

Pendant la phase de complication, il est possible de réaliser une cystoscopie afin de mettre en évidence des lésions au niveau du système urogénital. La radiographie est utilisée afin d'observer des calcifications vésicales, urétrales ou, dans certains cas plus avancés, une calcification complète de la vessie. Dans les cas de bilharziose du système nerveux central, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) sera nécessaire pour mettre en évidence un rétrécissement médullaire dans le cerveau.

5. Traitement de la pathologie

La lutte contre la schistosomiase impose une stratégie globale comprenant le traitement à grande échelle des populations à risques, l'accès à l'eau potable, l'amélioration de l'assainissement, l'éducation sanitaire des populations ainsi que la lutte contre l'hôte intermédiaire, le mollusque [OMS, 2013].

5.1 Education des populations

Comme nous l'avons vu au cours de cette introduction, l'eau constitue un facteur essentiel dans la chaîne épidémiologique de la bilharziose. Dans les zones endémiques, les femmes et les enfants sont quotidiennement exposés à des eaux contaminées par le schistosome. L'éducation sanitaire et la prévention de la contamination des eaux par les matières fécales et les urines sont difficiles à mettre en place car elles se heurtent à des habitudes et à des impératifs de vie quotidienne. De plus, la mise en place de campagne de prévention à grande échelle s'avère compliquée car elle nécessite des moyens financiers et humains importants. Cependant, en Arabie Saoudite et à Porto Rico où des investissements ont aidés à mettre en place de larges campagnes de prévention, cette stratégie a permis d'obtenir des résultats intéressants dans la lutte anti-schistosome.

5.2 Contrôle vectoriel

Une autre stratégie utilisée dans la lutte contre la schistosomiase consiste à éradiquer, dans les zones endémiques, les populations de mollusques vecteurs de la pathologie et essentiels au cycle de vie du schistosome. Cette stratégie repose sur l'utilisation de mollusquicides ou de plantes aquatiques mollusquicides ainsi que sur différentes méthodes biologiques telles que l'implantation de microparasites, d'autres parasites trématodes, de prédateurs ou de souches de mollusques compétiteurs. L'élimination des végétaux dont se nourrissent les mollusques a également été proposée pour diminuer ou éradiquer les populations de gastéropodes. [Madsen, 1990]. L'utilisation de mollusquicides à grande échelle est difficile à mettre en place et s'avère onéreuse. De plus, cette stratégie ne présente pas un impact durable sur la diminution de la transmission de la maladie. L'utilisation du niclosamide dans la région de Capim Branco (MG, Brésil) a permis une réduction importante du nombre de mollusques *B. glabrata* infestés. Néanmoins, 3 mois après l'arrêt de l'utilisation du mollusquicide, la population de mollusque s'est rétablie [Coura-Filho *et al.*, 1992]. Par ailleurs, l'utilisation massive et répétée de certains mollusquicides a un impact néfaste sur l'environnement en détruisant la faune et la flore

dans les zones traitées. Toutefois, l'utilisation des mollusquicides dans les zones endémiques conjuguée à celle de la chimiothérapie sur les populations infestées reste une stratégie de contrôle envisageable. En effet, dans une étude récente menée au Kenya, il a été montré que l'utilisation du niclosamide dans la rivière Kambu associée à celle du Praziquantel® (PZQ) pour traiter les populations infestées permet un meilleur contrôle à long terme de l'incidence de la schistosomiase. De plus, il a été observé une régression de l'hépatosplénomégalie chez les populations traitées au PZQ [Kariuki *et al.*, 2013]. Il faut néanmoins préciser que la rivière traitée ne représente pas une source importante piscicole pour les populations, et que la dilution du niclosamide en aval de la zone de traitement a prévenu tout effet néfaste sur les populations de poissons.

Néanmoins, des méthodes plus écologiques peuvent être utilisées: l'assèchement périodique des canaux d'irrigation et la destruction des végétaux dont se nourrissent les mollusques sont deux exemples qui ont permis, dans certaines zones endémiques, un contrôle de la transmission de la bilharziose. L'utilisation de mollusques compétiteurs des hôtes intermédiaires est activement explorée, notamment au Brésil où la souche Taim de *Biomphalaria tenagophila* est totalement résistante à l'infection par *S. mansoni*. [Nacif-Pimenta *et al.*, 2012]. L'élevage à grande échelle de la souche Taim est actuellement entrepris au Brésil, mais les résultats de l'implantation de cette souche sur le terrain ne sont pas encore connus [Rosa *et al.*, 2013]. Néanmoins, dans certaines zones endémiques pour la schistosomiase, l'introduction intentionnelle ou accidentelle d'autres gastéropodes a permis d'éliminer l'hôte intermédiaire du schistosome. Ainsi, en Guadeloupe et à Porto Rico, l'introduction de *Marisa cornuarietis* a permis d'éliminer *B. glabrata* [Pointier et Giboda, 1999]. Il en est de même pour *Melanoides tubercula* qui a été utilisé avec succès au cours d'un projet visant à éliminer la schistosomiase à St Lucie [Jordan, 1985]. De plus, une étude réalisée sur les mêmes sites, 14 ans plus tard, a permis de confirmer l'élimination totale de *B. glabrata* [Pointier, 1993]. Cette stratégie représente donc une approche pertinente pour le contrôle durable de la schistosomiase, particulièrement dans le cas de foyers d'infestation isolés et où le risque écologique potentiel de l'introduction d'une espèce de mollusque étrangère est limité.

5.3 La chimiothérapie

A ce jour, la chimiothérapie est le moyen de lutte contre la schistosomiase qui reste le plus efficace sur la réduction de la morbidité dans les zones endémiques. Cependant, l'arsenal thérapeutique reste limité à l'utilisation du PZQ et à quelques drogues peu utilisées, qui ont été abandonnées. Découvert au milieu des années 70 [Thomas et Gönnert, 1977], le

PZQ a montré une efficacité non négligeable dans le traitement de la bilharziose et s'avère également efficace sur d'autres trématodes et sur certains cestodes. Ce médicament est très bien toléré et ne provoque que très peu d'effets secondaires chez les patients traités. Le mode d'action précis de ce principe actif, sur les vers adultes de schistosome, est encore inconnu. Cependant, il provoque des contractions musculaires violentes et des dommages au niveau du tégument des vers adultes qui vont permettre de les décrocher des vaisseaux sanguins et de les éliminer progressivement par le système immunitaire. Le PZQ est un dérivé de la pyrazino isoquinoline qui était utilisé, à l'origine, comme anxiolytique et qui est aujourd'hui administré aux patients en une seule dose orale de 40 mg/kg. Des doses plus fortes, équivalentes à 60 mg/kg, sont généralement administrées aux patients atteints de *S. japonicum*.



Figure 7: Le Praziquantel® ou Biltricide (Bayer). (A) Conditionnement et comprimés de PZQ. (B) Représentation de la molécule de PZQ.

Malgré son efficacité reconnue sur l'ensemble des espèces de schistosomes capables d'infester l'homme, le PZQ présente peu, voire aucun effet sur les stades œuf et larvaires du schistosome. Or, dans les zones endémiques, les individus sont très souvent soumis à des infestations successives et hébergent, au sein de leur organisme, différents stades de développement du parasite. Ainsi, l'utilisation de plusieurs doses de PZQ est nécessaire pour obtenir une guérison totale.

L'utilisation massive et répétée du PZQ a permis en Egypte, par exemple, de réduire considérablement la morbidité associée à *S. mansoni* [Fenwick *et al.*, 2003]. Néanmoins, son utilisation intensive dans certaines régions d'Egypte ou du Kenya a également entraîné le développement de résistances [Ismail *et al.*, 1999]. De plus, des expériences *in vitro* ont montré, qu'il est possible d'obtenir des souches de parasites résistantes au PZQ [Fallon et Doenhoff, 1994]. Ce mécanisme de résistance répond aux lois Mendélienne et est dû à un gène ou un groupe de gènes dominants [Liang *et al.*, 2003]. Actuellement, l'apparition de ces isolats de résistance est mineure mais on estime qu'après une vingtaine d'années d'utilisation massive du PZQ, celle-ci pourrait devenir beaucoup plus sérieuse [Ross *et al.*, 2002].

Parmi les quelques médicaments efficaces dans le traitement de la bilharziose, on peut citer également l'Artéméthér qui est un dérivé de l'Artémisinine utilisée également dans le traitement du paludisme. Cette molécule présente l'avantage d'être active sur les schistosomules pendant 21 jours post-infection et est capable de tuer tous les schistosomules immatures si elle est administrée toutes les deux semaines [Xiao *et al.*, 1996]. L'Artéméthér est également actif sur toutes les espèces de schistosomes capables d'infester l'homme et son utilisation en combinaison avec le PZQ produit *in vivo* chez le lapin, un effet synergique sur la mort des vers adultes [Shuhua *et al.*, 2000]. Les doses requises pour traiter la bilharziose avec l'Artéméthér sont plus faibles que celles utilisées pour traiter le paludisme. Néanmoins, son utilisation dans des zones endémiques à la fois pour le paludisme et pour la schistosomiase, est très peu probable car elle pourrait à long terme faire émerger des souches résistantes de *Plasmodium falciparum*.

Actuellement, la seule alternative au PZQ pour traiter la bilharziose est l'utilisation de l'oxamniquine dans le cas d'une infection par *S. mansoni* et celle du Métrifonate dans le cas d'une infection par *S. haematobium*. Cependant, l'utilisation de ces deux médicaments est très restreinte ou a été abandonnée car leur coût de production sont très élevés et leur spectre d'action est limité à une seule espèce de schistosome.

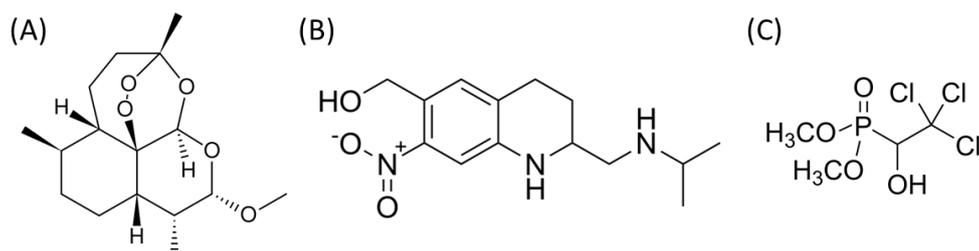


Figure 8: Molécules alternatives au Praziquantel®. (A) Artéméthér, (B) Oxamniquine et (C) Métrifonate.

5.4 La vaccination

Comme nous venons de le voir, la chimiothérapie a permis dans certains pays endémiques de réduire significativement la morbidité due à la schistosomiase. Néanmoins, son utilisation n'a pas permis d'interrompre la transmission [King *et al.*, 2006] et une alternative intéressante serait le développement d'un vaccin. Une stratégie vaccinale dirigée contre la schistosomiase permettrait de protéger les populations à risques et préviendrait les réinfections successives qui sont fréquentes dans les zones endémiques. Actuellement, plusieurs candidats vaccins sont en cours de développement et utilisent comme antigènes de l'espèce *S. mansoni*, la paramyosine, l'isomérase triose phosphate, la tétraspanine 2, Sm14, la Sm23, l'IrV-5 ainsi que la glutathion-S-transférase Sm28-GST [McManus et

Loukas, 2008]. Malgré la découverte et la publication de plusieurs candidats vaccins potentiels utilisant des antigènes de *S. mansoni*, à ce jour seul un vaccin, appelé BILHVAX ou 28-KDa GST de *S. haematobium*, est entré en essai clinique [Capron *et al.*, 2005]. Développé à l'Institut Pasteur de Lille, ce vaccin, actuellement en essai clinique de phase III, utilise la protéine Sh28 comme antigène. La vaccination entraîne la production d'anticorps qui bloquent l'activité enzymatique de la Sh28-GST, indispensable à la production des œufs et impliquée dans l'élimination des produits toxiques du métabolisme chez le schistosome [Capron *et al.*, 2005]. Toutefois, ce vaccin ne présente pas d'effet préventif mais permet, en association avec un traitement au PZQ, de contrôler la pathologie due à l'infestation et augmente la protection vis-à-vis de la réinfestation.

D'autres candidats vaccins dirigés contre *S. mansoni* sont également bientôt prêts à faire leur entrée en phase d'essai clinique [Oliveira *et al.*, 2008]. Parmi ces candidats, la protéine Sm14, capable de se fixer aux acides gras, a montré *in vivo* chez la souris et le lapin une protection vis-à-vis de *S. mansoni* mais également sur un autre trématode, *Fasciola hepatica* [Tendler et Simpson, 2008]. Un autre candidat, prêt à entrer en phase clinique, est le vaccin à ADN Sm-p80 qui code pour une grande sous unité d'une protéase calcium-dépendante qui a montré un effet protecteur chez le babouin comparable à un vaccin utilisant comme antigène des cercaires irradiées [Zhang *et al.*, 2010].

Plus récemment, des équipes brésiliennes ont pu montrer qu'un fragment du domaine extracellulaire de la protéine membranaire Tetraspanine 2 (TSP2) de *S. mansoni* était un antigène prometteur qui permet chez la souris d'obtenir un niveau élevé de protection [Tran *et al.*, 2006]. Une autre équipe a montré que la protéine TSP2 de *S. japonicum* présente également un effet protecteur chez la souris [Yuan *et al.*, 2010].

Dans la seconde partie de cette introduction, à travers quelques rappels historiques nous définirons la notion d'épigénétique puis nous aborderons différents mécanismes épigénétiques impliqués dans la modification de la structure de la chromatine.

II Généralités - Epigénétique

1. Un peu d'histoire... De la génétique à l'épigénétique

La génétique est une branche de la biologie qui étudie les caractères héréditaires des individus, leur transmission au cours des générations ainsi que leurs modifications. Gregor Mendel (1822-1884) est considéré comme le père fondateur de la génétique en établissant des lois qui définissent la manière par laquelle les gènes se transmettent de génération en

génération. En effet, pendant huit années, il a mené, dans le jardin de son monastère, des expériences minutieuses portant sur la reproduction de quelques 12 000 plants de pois comestibles. Il a déterminé sept caractères facilement identifiables à étudier, dont chacun peut présenter deux états différents (forme et couleur de la graine, couleur de l'enveloppe, forme et couleur de la gousse, position des fleurs et longueur de la tige).

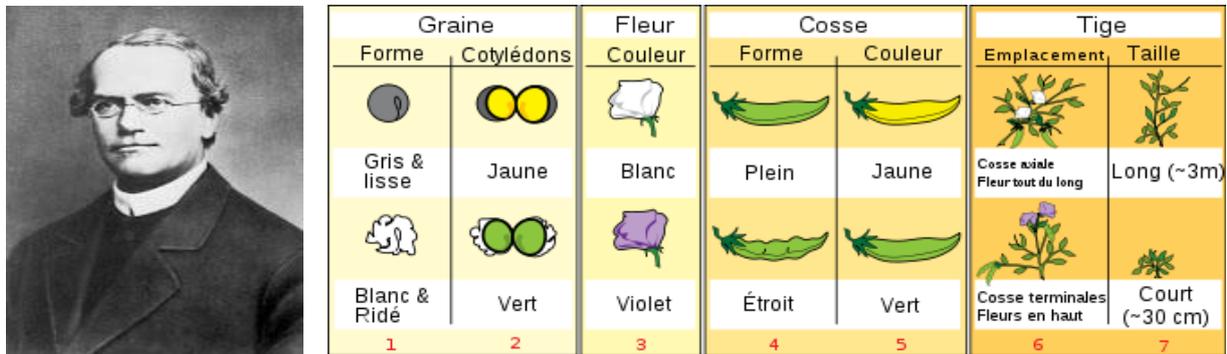


Figure 9: Les lois de Mendel fondatrices de la génétique moderne. A gauche, photographie de Gregor Mendel (1822-1884). A droite, les différents caractères étudiés par Mendel lors de ses expériences de croisements de plants de pois.

Sa méthodologie rigoureuse lui a permis de déterminer avec précision l'évolution des caractères étudiés sur plusieurs générations, à la suite de croisements impliquant des lignées pures qui diffèrent par un ou plusieurs caractères. Ainsi, grâce à ses travaux, en 1866, il affirme qu'un caractère héréditaire peut exister sous différentes versions, les unes dominantes, les autres récessives [Mendel, 1866]. Par la suite, il en déduira les notions d'homozygotie et d'hétérozygotie. Ces résultats novateurs, qui vont à l'encontre de la théorie depuis longtemps admise, de l'hérédité dite par mélanges seront ignorés par la communauté scientifique pendant près de 35 ans.

Cependant, plusieurs découvertes importantes vont voir le jour pendant ces nombreuses années. En 1869, par exemple, l'ADN est isolé pour la première fois par le biologiste suisse, Friedrich Miescher (1844-1895), qui a publié un article dans lequel il annonce avoir isolé une substance riche en phosphore [Dahm, 2005]. Il utilisera le terme de nucléine pour décrire cette substance présente dans toutes les cellules, y compris dans le sperme. S'intéressant à la reproduction du saumon, il formulera l'hypothèse que la nucléine peut avoir un rôle dans la transmission des caractères héréditaires. Dix années plus tard, en 1878, Walther Flemming (1843-1905), anatomiste allemand, décrit pour la première fois le mécanisme de mitose et utilise les termes de prophase, métaphase, anaphase et télophase pour décrire le mécanisme de division cellulaire [Flemming, 1878].

Il a fallu attendre l'année 1900 pour que les théories de Mendel soit prises en considération. Ainsi, trois botanistes, l'allemand Carl Correns (1864-1933), le néerlandais Hugo de Vries

(1848-1935) et l'autrichien, Erich von Tschermak-Seysenegg (1871-1962) vont redécouvrir, séparément mais en même temps les travaux de Mendel [Correns, 1950]. Ces résultats, de nouveau publiés, on cette fois-ci fait sensation dans le monde scientifique.



En 1903, Walter Sutton (1877-1916, photo ci-contre), médecin et généticien américain, observe pour la première fois une méiose et propose la théorie de l'hérédité chromosomique en émettant l'hypothèse que les chromosomes seraient le support des facteurs héréditaires décrits auparavant par Mendel [Sutton, 1903]. La même année, le britannique William Bateson (1861-1926) est le premier à démontrer que les lois de Mendel sont applicables chez un animal en utilisant la poule comme modèle expérimental. Il introduit les termes *homozygote*, *hétérozygote* et *allélomorphe* (plus tard, abrégé allèle). En France, la génétique mendélienne sera longtemps marginalisée par les biologistes du courant « neo-lamarckiens », attachés à l'idée de l'hérédité des caractères acquis. Néanmoins, en 1902, Lucien Cuénot (1866-1951) sera le premier généticien français à démontrer l'application des lois de Mendel à l'hérédité de la couleur du pelage chez la souris [Cuénot, 1902].

En 1909, le botaniste danois Wilhelm Johannsen (1857-1927) propose l'utilisation du mot *gène* pour désigner les facteurs héréditaires de Mendel, le mot *génotype* pour parler des facteurs attachés à une race entière ainsi que le mot *phénotype* pour décrire les facteurs attachés à un seul individu [Roll-Hansen, 2009]. William Bateson propose alors l'introduction du terme génétique pour désigner la science des gènes.



D'abord peu favorable au mendélisme, Thomas Morgan (1866-1945, photo ci-contre), embryologiste et généticien américain, va jeter les fondements de la génétique moderne. En effet, grâce aux recherches qu'il mène avec son équipe sur la mouche du vinaigre, *Drosophila melanogaster*, il démontre formellement que les chromosomes sont le support des gènes en introduisant les notions de liaisons et de recombinaisons génétiques. En 1913, Morgan et son étudiant, Alfred Sturtevant (1891-1970), construisent la première carte génétique du chromosome X de la drosophile. Ainsi, par ces nombreuses recherches sur la drosophile, Morgan va consolider la théorie chromosomique de l'hérédité. Il recevra pour ses travaux le prix Nobel de médecine en 1933.

En 1927, un autre étudiant de Morgan, Hermann Muller (1890-1967), en s'intéressant aux mutations chez la drosophile, démontre qu'il est possible d'augmenter de façon considérable la fréquence de celles-ci en soumettant les mouches aux effets des radiations ionisantes. Ces travaux vont accélérer la recherche en cartographie génétique et permettront à Muller d'obtenir en 1946, le prix Nobel de physiologie.

Pendant la seconde guerre mondiale, deux américains, George Beadle (1903-1989) et Edward Tatum (1909-1975), au cours de recherches sur une moisissure, *Neurospora crassa*, vont noter qu'une mutation dans son génome peut perturber l'activité chimique de cette dernière en empêchant la formation d'une enzyme. Ils vont donc émettre l'hypothèse qu'un gène est à l'origine de la formation d'une enzyme [Beadle et Tatum, 1941]. Pour leurs travaux, ils recevront en 1958, le prix Nobel de physiologie.



C'est en 1944 que le canadien Oswald Avery (1877-1955, photo ci-contre) en s'intéressant à la transformation bactérienne chez le pneumocoque émet pour la première fois l'hypothèse que l'ADN est le support de l'information génétique qui compose les gènes et donc les chromosomes. Il faudra attendre 1952, pour que deux américains, Alfred Hershey (1908-1997) et Martha Chase (1927-2003) confirment ces résultats grâce à une série d'expériences sur des bactériophages. Ces derniers vont, en effet, démontrer formellement que l'ADN est le support de l'information génétique.

Plusieurs chercheurs vont ensuite s'intéresser à élucider la structure de l'ADN. Ainsi, en 1953, Frederick Wilkins (1916-2004) et Rosalind Franklin (1920-1958), deux biologistes britanniques réalisent plusieurs radiographies aux rayons X de l'ADN (Fig 10A). Ces clichés seront essentiels à James Watson (né en 1928) et à Francis Crick (1916-2004) pour proposer que l'ADN est une molécule organisée en structure hélicoïdale et qu'elle est composée chimiquement de bases puriques (adénine (A), guanidine (G)) et pyrimidiques (thréonine (T), Cytosine (C)) qui présentent des structures complémentaires d'un point de vue stérique (Fig 10B et 10C) [Watson et Crick, 1953]. Pour leurs travaux, ils ont reçu en 1962 le prix Nobel de physiologie.

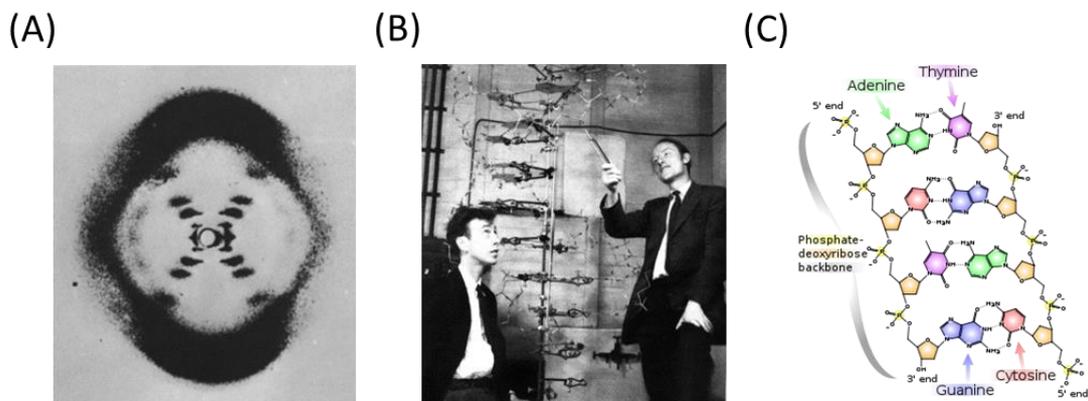


Figure 10: Découverte de la structure de la molécule d'ADN. (A) Cliché au rayons X de l'ADN, pris par Rosalind Franklin à la fin de 1952. (B) James Watson et Francis Crick devant une maquette de la double hélice d'ADN. (C) Structure chimique de l'ADN avec les liaisons hydrogènes représentées entre les différentes bases en pointillés.

Dans les années suivantes, la génétique va connaître de grandes avancées. En 1957, le mécanisme de réplication de l'ADN est mis en évidence. Quatre ans plus tard, en 1961, deux français, François Jacob, (1920-2013) et Jacques Monod (1910-1976) élucident le mécanisme de synthèse des protéines et confirment l'existence d'un code génétique avancé par Watson et Crick [Jacob et Monod, 1961]. Ils recevront tous les deux avec André Lwoff, en 1965, le prix Nobel de physiologie pour leurs travaux. En 1966, le déchiffrement du code génétique est achevé par Marshall Nirenberg (1927-2010), Har Khorana (1922-2011) et Robert Holley (1922-1993) qui recevront en 1968 le prix Nobel de physiologie pour leur découverte.



L'épigénétique a suscité un intérêt particulier à partir du moment où les liens entre le génotype et le phénotype se sont peu à peu précisés. C'est à Conrad Hal Waddington (1905-1975, photo ci-contre), généticien et professeur à l'université d'Edimbourg qui s'attache à comprendre le rôle des gènes dans le développement, que l'on doit le terme d'épigénétique en 1942. Il définit l'épigénétique comme une branche de la biologie qui étudie les relations de causes à effets entre les gènes et leurs produits, faisant apparaître le phénotype. A l'époque, on ignorait que l'ADN est le support de l'hérédité. Néanmoins, une étape décisive dans l'émergence de l'épigénétique va être franchie avec les travaux de François Jacob, Jacques Monod et André Lwoff. En effet, ces trois scientifiques vont démontrer l'importance d'un facteur de l'environnement, le lactose, dans le contrôle de l'expression d'un gène de la bactérie *E. coli* lui permettant d'utiliser le lactose comme source d'énergie [Jacob et Monod, 1964]. Le concept de l'épigénétique, va ensuite connaître une relative déshérence jusque dans les années 1980.



C'est le chercheur australien, Robin Holliday (né en 1932, photo ci-contre) qui va relancer le concept de l'épigénétique en 1975 en observant dans des cellules en culture des changements de caractères qui sont transmis au cours des divisions cellulaires de manière trop fréquente pour être dus à des mutations de l'ADN. Ainsi, il propose un modèle moléculaire, basé sur la méthylation des cytosines de l'ADN, pour expliquer les changements de l'activité des gènes qui seraient transmis d'une génération à une autre. Il suggère que cette modification de l'ADN peut avoir un effet non négligeable sur l'expression des gènes au cours du développement [Holliday et Pugh, 1975]. Depuis les années 1990, la recherche sur l'épigénétique est florissante et d'autres mécanismes moléculaires vont également être reconnus comme d'importants facteurs de régulation de l'activité génique. Parmi ces mécanismes, on peut citer, la méthylation des cytosines de l'ADN, l'ensemble des modifications touchant les histones ainsi que les effets régulateurs des ARN non codants.

Dans son sens moderne, on définit l'épigénétique comme l'étude de la variation de l'expression des gènes liée à une modification de la structure de la chromatine, sans modification de la séquence d'ADN, et transmissible d'une cellule mère à ses cellules filles.

Dans la suite de cette introduction, nous allons nous intéresser plus précisément à 3 mécanismes épigénétiques affectant la structure de la chromatine et touchant plus particulièrement les histones. Nous aborderons les rôles des facteurs de remodelage de la chromatine, la notion de variants d'histones, ainsi que les modifications post-traductionnelles des histones.

2. La structure de la chromatine

Dans le noyau des cellules eucaryotes, le support de l'information génétique est organisé en une structure dynamique et complexe, composé d'ADN et de protéines, que l'on nomme chromatine. Comme nous le verrons plus tard, cette structure peut être remodelée, condensée ou décondensée afin d'activer ou de réprimer la transcription.

2.1 Le nucléosome

L'unité structurale de la chromatine est le nucléosome. Il est constitué d'un octamère de protéines basiques, les histones, autour duquel environ 146 paires de bases d'ADN sont enroulées (Fig 11). Cette structure forme un cylindre de 5,5 nm de haut et de 11 nm de diamètre. Le nucléosome permet ainsi de former le premier ordre de compaction de la chromatine et l'on estime que les 146 paires de bases enroulées autour de l'octamère d'histones sont six fois plus compactées qu'un fragment d'ADN nu de même longueur. Au sein de la chromatine, les nucléosomes adjacents sont reliés entre eux par des segments d'ADN, dits de liaison, dont la taille varie selon l'espèce et le type cellulaire. L'enchaînement des nucléosomes forme un nucléofilament de 11 nm de diamètre rappelant l'aspect d'un collier de perles.

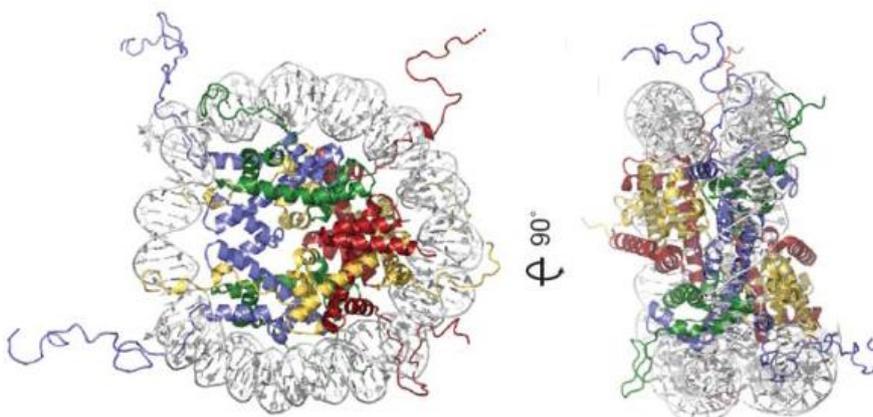


Figure 11: Structure cristallographique d'un nucléosome obtenue par diffraction au rayon X. L'ADN est représenté en blanc, l'histone H3 en bleu, H4 en vert, H2A en jaune et H2B en rouge [Elsässer et D'Arcy, 2012].

2.2 Les histones

Les protéines de la famille des histones sont essentielles à l'homéostasie et à la compaction du génome. En effet, de par leurs interactions étroites avec l'ADN, elles peuvent moduler l'accessibilité au génome et, par conséquent, avoir un rôle essentiel dans l'activité des enzymes nucléaires telles que les polymérases. Les principales protéines de cette famille sont les histones H2A, H2B, H3 et H4 mais il existe également des variants d'histones comme nous le verrons par la suite. Le domaine central du nucléosome est un octamère de protéines composé de deux copies de chacune des principales histones. Les histones H3 et H4 vont s'associer en tétramère alors que les histones H2A et H2B vont s'organiser en dimère (Fig 12).

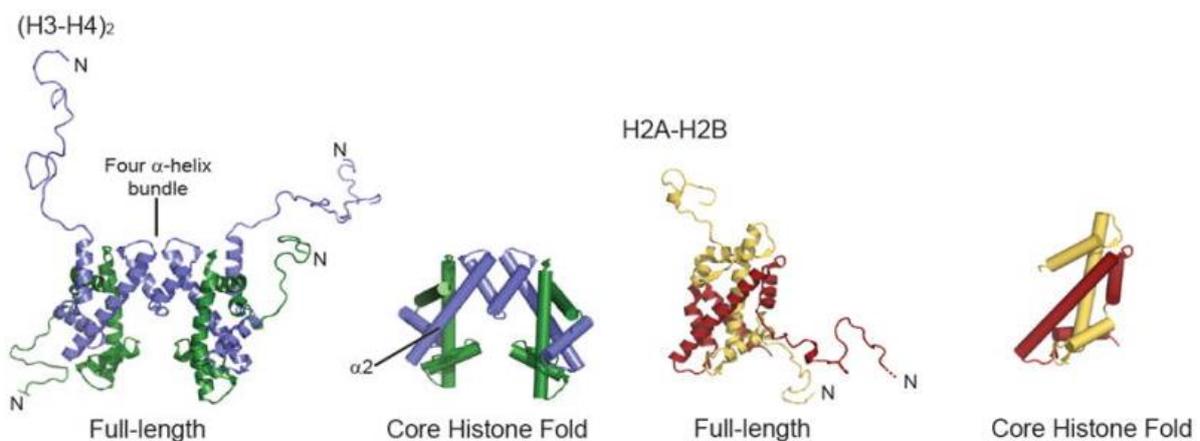


Figure 12: Structure tridimensionnelle du tétramère d'histones $(H3-H4)_2$ et du dimère d'histones $(H2A-H2B)$. L'histone H3 est représentée en bleu, H4 en vert, H2A en jaune et H2B en rouge [Elsässer et D'Arcy, 2012].

Les histones sont des protéines qui présentent une structure globalement conservée entre elles. Elles sont caractérisées par la présence d'un motif « histone fold » d'environ 65 acides aminés structurés en trois hélices- α séparées par deux boucles. Ce motif est impliqué dans l'interaction histone-histone et dans l'interaction histone-ADN. De plus, chaque histone présente une queue à son extrémité N-terminale, plus variable et enrichie en lysine. Ces extrémités non structurées se retrouvent à l'extérieur du nucléosome et font ainsi l'objet de nombreuses modifications post-traductionnelles permettant, entre autres le rapprochement des nucléosomes entre eux. Les histones H2A et H2B présentent également une queue à leur extrémité C-terminale.

Parmi les histones importantes dans la structure du nucléosome, on peut également citer l'histone H1 (et son variant H5 spécifique des cellules précurseurs des érythrocytes) qui se fixe aux segments d'ADN de liaison séparant deux nucléosomes. Ainsi, elle est à la fois

impliquée dans la stabilisation de la structure du nucléosome mais aussi dans la formation des niveaux supérieurs de condensation de l'ADN en rapprochant les nucléosomes entre eux, entraînant ainsi la formation de fibres plus épaisses (30 nm) que les nucléofilaments (11nm) précédemment décrits.

2.3 Assemblage du nucléosome

La production de protéines histones recombinantes a permis d'établir un modèle séquentiel d'assemblage du nucléosome *in vitro*. La capacité des histones à s'associer entre elles pour former des dimères, est dépendante de l'environnement ionique dans lequel elles se trouvent. Ainsi, l'hétéro-dimérisation des histones H3 et H4 s'effectue à des forces ioniques élevées alors que celle des histones H2A et H2B nécessite des forces ioniques plus faibles [Banks et Gloss, 2003]. De plus, il a été montré, qu'en absence d'autres protéines ou d'ADN, le dimère H3-H4 est présent en équilibre avec le tétramère (H3-H4)₂ à des forces ioniques physiologiques [Baxevanis *et al.*, 1991]. L'utilisation d'un gradient de sel est donc nécessaire pour étudier l'assemblage *in vitro* du nucléosome. Ce modèle séquentiel et réversible propose que le tétramère (H3-H4)₂ (ou deux dimères H3-H4) est le premier à se déposer sur l'ADN et que cette étape est suivie par l'ajout de deux dimères H2A-H2B pour former le nucléosome (Fig 13).

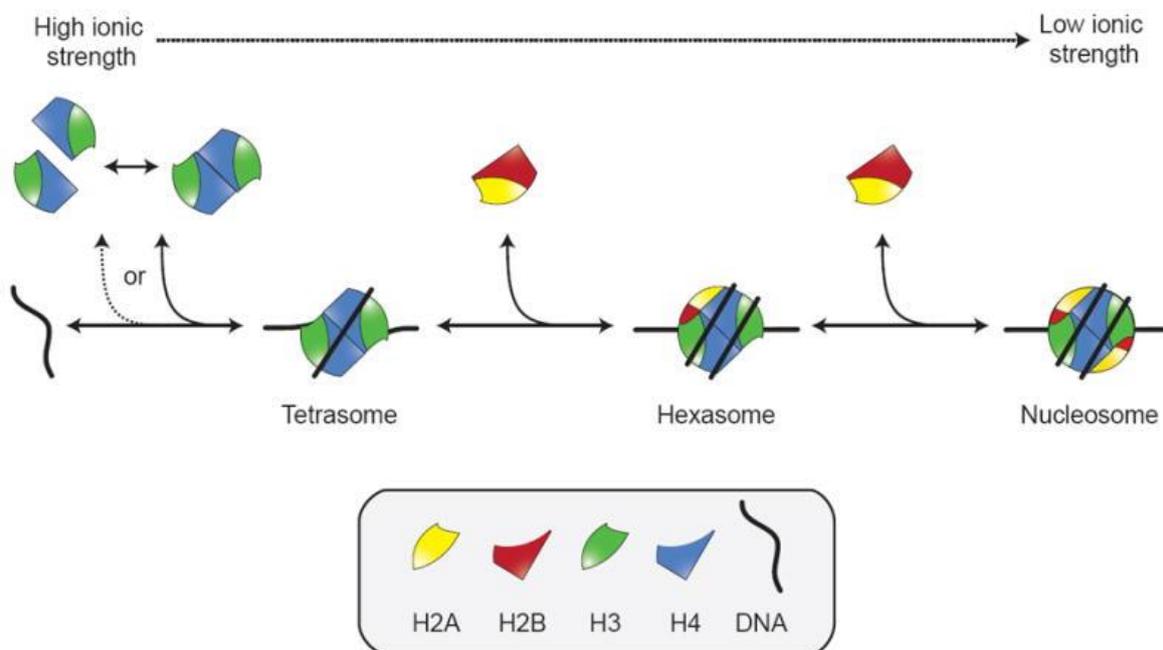


Figure 13: Modèle séquentiel d'assemblage *in vitro* du nucléosome. Deux dimères H3-H4 se fixent à l'ADN pour former un tétrasome. Cette première étape est suivie de l'addition de deux dimères H2A-H2B pour former le nucléosome. Un hexasome correspond à l'addition d'un dimère H2A-H2B sur le tétrasome. Ce processus est réversible en utilisant un gradient de sel pour faire varier la force ionique du tampon [Elsässer et D'Arcy, 2012].

Plusieurs études ont confirmé ce modèle séquentiel et réversible *in vitro* mais sa pertinence *in vivo* est remise en question [Smith et Stillman, 1991]. En effet, dans la cellule, plusieurs étapes sont nécessaires avant la formation du nucléosome (Fig 14). Ainsi, les histones synthétisées dans le cytoplasme devront dans un premier temps se dimériser puis être importées dans le noyau de la cellule. Dans un deuxième temps, les dimères d'histones seront recrutés par l'ADN au niveau de sites spécifiques avant de s'associer pour former le nucléosome. Tout au long de ces étapes, d'autres protéines sont impliquées dans ce processus. Les protéines chaperonnes telles que Hsp70 et Hsp90 sont, en effet, nécessaires pour la formation des dimères d'histones dans le cytoplasme [Campos *et al.*, 2010]. De nombreuses autres protéines chaperonnes d'histones seront indispensables à l'assemblage du nucléosome pour prévenir des interactions non spécifiques (mises en évidence *in vitro* à des forces ioniques physiologiques) entre les histones et d'autres protéines cellulaires, mais aussi avec l'ADN et l'ARN dans le noyau [Laskey *et al.*, 1978 ; Ellis, 2006].

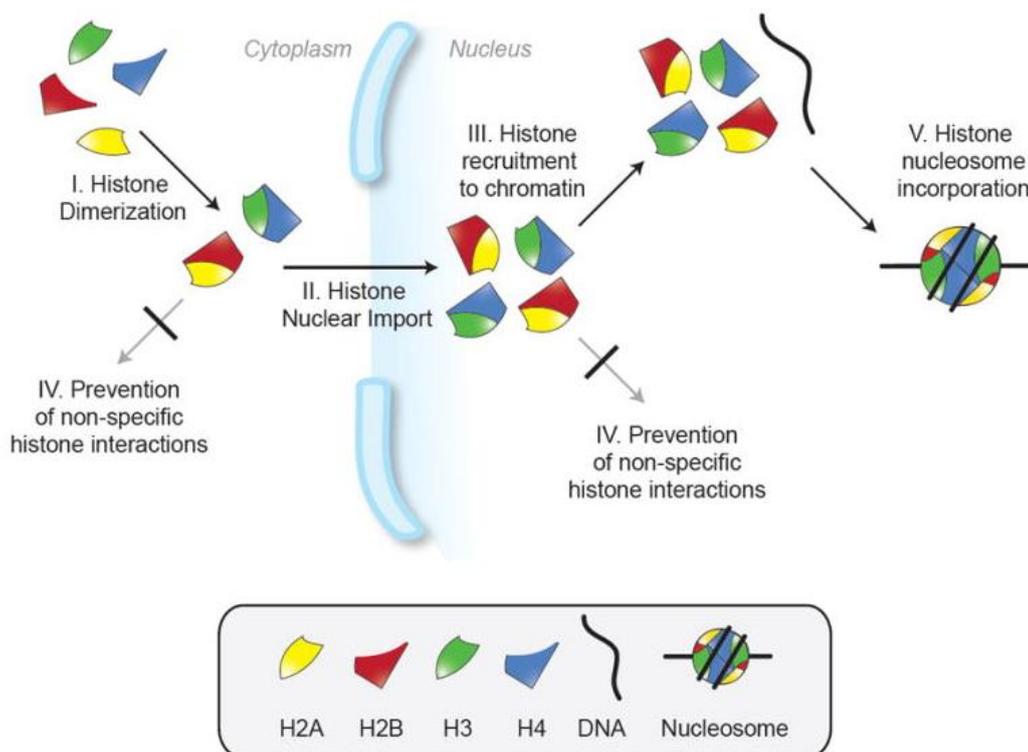


Figure 14: Prérequis pour l'assemblage *in vivo* du nucléosome. Les protéines chaperonnes d'histones facilitent la formation du nucléosome et sont impliquées dans toutes les étapes de l'assemblage (I à IV) [Elsässer et D'Arcy, 2012].

2.4 Etats de condensation de la chromatine

La chromatine est une structure dynamique qui est caractérisée par différents niveaux de condensation permettant de compacter tout le génome d'un organisme sous forme de chromosome dans un compartiment restreint: le noyau de la cellule (Fig 15).

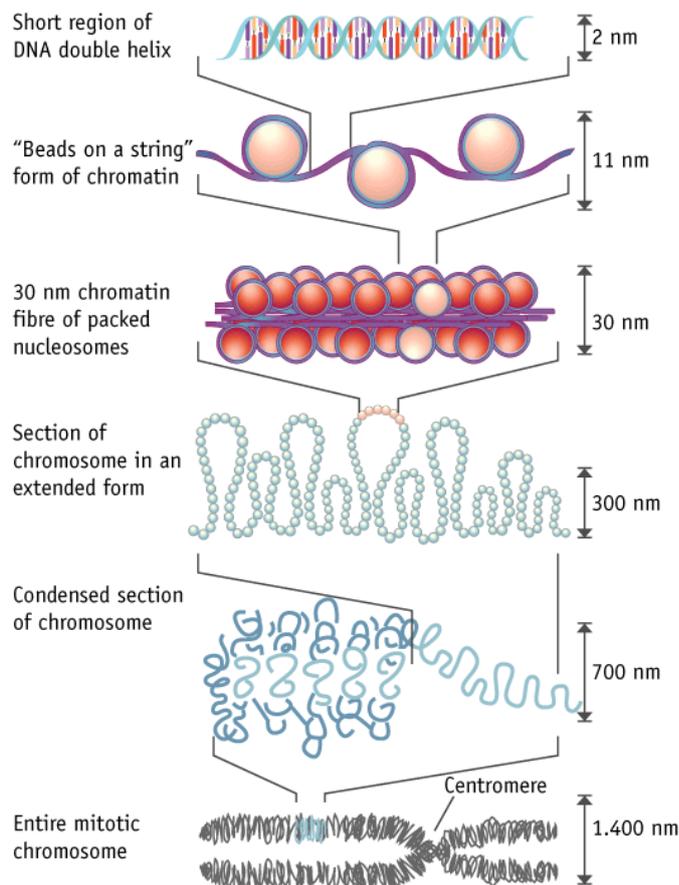


Figure 15: Organisation de l'ADN dans la structure de la chromatine. Le plus petit niveau d'organisation est le nucléosome dans lequel l'ADN est enroulé deux fois (165 paires de bases) autour d'un octamère d'histones. Dans les niveaux supérieurs d'organisation de la structure de la chromatine, les nucléosomes se rapprochent entre eux aboutissant à la condensation de l'ADN. Le chromosome correspond au niveau de condensation de l'ADN le plus élevé [Felsenfeld et Groudine, 2003].

On distingue deux principaux états de condensation chromatinienne qui ont un rôle majeur dans la régulation de la transcription des gènes. La première, l'euchromatine, est constituée d'ADN décondensé permettant ainsi, la transcription des gènes en augmentant l'accessibilité de l'ADN à divers facteurs nucléaires comme les facteurs de transcription. La seconde, l'hétérochromatine, qui peut être constitutive ou facultative, est constituée d'ADN condensé, permettant la répression de gènes. L'hétérochromatine constitutive concerne des séquences non codantes comme les séquences satellites et répétées, généralement localisées au niveau des centromères et des télomères des chromosomes. L'hétérochromatine facultative concerne des régions de l'ADN dont la structure euchromatine/hétérochromatine peut varier suivant le type cellulaire afin de réprimer temporairement l'expression de gènes.

Ces changements d'état de condensation sont essentiels au cours du cycle cellulaire. Ainsi, lors de la mitose, la chromatine est fortement condensée pour permettre la ségrégation des chromosomes. Par contre, dans les autres phases du cycle cellulaire, elle devient diffuse, résultat d'une décondensation partielle.

Nous allons maintenant aborder les différents mécanismes épigénétiques impliqués dans la modification de l'état de condensation de la chromatine et, par conséquent, dans la régulation de la transcription des gènes.

3. Modifications de l'état de condensation de la chromatine

3.1 Les facteurs de remodelage de la chromatine

Les facteurs de remodelage sont des complexes protéiques capables de modifier la structure et la répartition des nucléosomes au sein de la chromatine. Ces complexes, ADN dépendants, présentent un domaine ATPase semblable à celui que l'on retrouve chez les enzymes de type hélicase. Ils utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour altérer la structure des nucléosomes en déstabilisant les interactions entre les histones et l'ADN et/ou en modifiant la répartition des nucléosomes sur la chromatine [Kingston et Narlikar, 1999]. La modification de la position du nucléosome s'effectue soit par glissement sur un même brin d'ADN (action en *cis*), soit par transfert du nucléosome sur un autre brin (action en *trans*). L'activité des complexes de remodelage entraîne donc un changement dans l'état de condensation de la chromatine et, par conséquent, dans l'activation ou la répression de l'expression de gènes, notamment dans les mécanismes de réplication et de réparation de l'ADN.

Les protéines de la famille des ATPases sont regroupées en trois superfamilles (Fig 16). Dans la superfamille 2 on retrouve les ATPases de la famille SNF2 (Sucrose Non Fermenting). Tous les complexes de remodelage de la chromatine ne présentent pas la même structure ni la même fonction mais ont tous en commun la présence d'une sous-unité ATPase, dite « motrice », semblable à celle que l'on retrouve dans la famille SNF2 des ATPases [Eisen *et al.*, 1995]. A l'intérieur de cette famille, on distingue 4 sous familles (SWI/SNF, ISWI, NURF/Mi-2 et INO80) composées des complexes de remodelage de la chromatine (Fig 16).

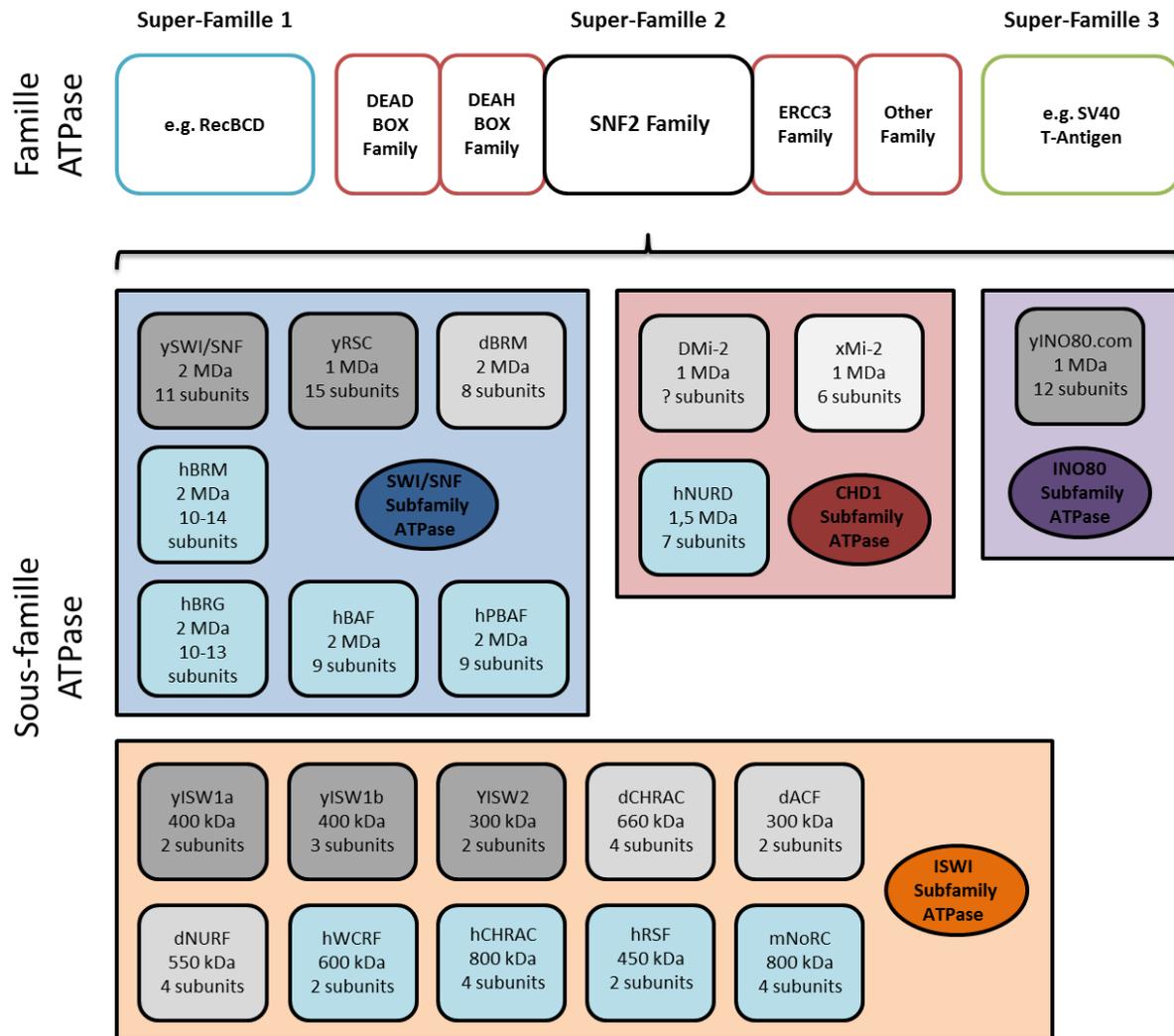


Figure 16: Membres des sous-familles SWI/SNF, ISWI, INO80 et CHD1 impliqués dans les complexes de remodelage de la chromatine. Les complexes sont représentés par des rectangles, leurs poids moléculaires ainsi que le nombre de sous-unités qui les composent sont mentionnés [D'après Lusser et Kadonaga, 2003].

A. La famille SWI/SNF (mating-type switching/Sucrose Non Fermenting)

Les complexes de remodelage de la famille SWI/SNF présentent tous une sous-unité ATPase, bien conservée avec deux domaines, DExx et HELICc, apparentés au domaine catalytique retrouvé chez les hélicases, un domaine HSA (Helicase-SANT-associated), impliqué dans la fixation de l'actine et un bromodomaine permettant la liaison du complexe aux histones acétylées (Fig 17). En plus de leur sous-unité ATPases, ces complexes de remodelage possèdent un nombre variable de sous-unités (de 8 à 15) qui sont impliquées dans leur fixation à l'ADN ainsi qu'à d'autres protéines pour participer au processus de remodelage.



Figure 17: Organisation des domaines fonctionnels de la sous-unité ATPase des membres de la sous-famille SWI/SNF. Cette sous-unité est composée d'un domaine DExx et d'un domaine HELICc séparés par une petite insertion. Ces domaines sont responsables de l'activité ATPasique. Les membres de la famille SWI/SNF possèdent également un domaine HSA, important dans la fixation de l'actine, et un bromodomaine essentiel à la fixation de lysines acétylées [Tang *et al.*, 2010].

La famille SWI/SNF a été découverte initialement chez la levure [Sudarsanam et Winston, 2000]. La purification de la protéine SWI2/SNF2p chez *Saccharomyces cerevisiae* a permis de montrer qu'elle faisait partie d'un complexe composé de 11 sous-unités polypeptidiques avec un poids moléculaire d'environ 2 KDa chacune. Ce complexe contient une sous-unité ATPase (SWI2/SNF2p) mais aussi, deux protéines de liaison à l'actine (Arp7p et Arp9), ainsi que d'autres sous-unités impliquées dans la liaison avec l'ADN ou avec des protéines. Ce complexe purifié altère *in vitro* la structure du nucléosome et cela de manière ATP dépendante [Vignali *et al.*, 2000].

Un autre complexe, appelé RSC (Remodeling the Structure of Chromatin) a également été identifié chez la levure [Cairns *et al.*, 1994]. Composé de 17 sous-unités, il montre de nombreuses similarités de structure avec le complexe SWI/SNF, notamment au niveau de sa sous-unité ATPase Sth1 qui est un homologue de SWI2/SNF2p. Néanmoins, les complexes RSC et SWI/SNF ne régulent pas les mêmes régions de la chromatine.

Chez l'homme, deux complexes homologues à ceux retrouvés chez la levure, ont été biochimiquement et génétiquement caractérisés. Le premier, le complexe BAF (Brg1 Associated Factors), homologue au complexe SWI/SNF de la levure, contient une des deux sous-unités ATPases hBRM (human Brahma) ou BRG1 (Brahma-related Gene 1). Le second, le complexe PBAF (Polybromo-associated BAF), similaire au complexe RSC de la levure ne possède que la sous-unité ATPase BRG1 [Mohrmann et Verrijzer, 2005].

Les complexes de la famille SWI/SNF sont capables de déplacer les nucléosomes le long de l'ADN par glissement mais aussi de catalyser l'éjection ou l'insertion d'un nucléosome permettant ainsi de remodeler la structure de la chromatine et donc d'en modifier son état de condensation [Saha *et al.*, 2006]. Si l'on s'intéresse au mouvement par glissement du nucléosome sur l'ADN, le modèle proposé fait intervenir plusieurs étapes. Dans une première étape, le complexe SWI/SNF s'attache à un nucléosome aboutissant à la déstabilisation des interactions entre les histones et l'ADN. La seconde, correspond à une translocation de l'ADN, initiée par la sous-unité ATPase du complexe de remodelage permettant la formation d'une boucle qui va se propager autour du nucléosome (Fig 18). Ces

deux étapes vont permettre le glissement du nucléosome sur l'ADN et ainsi générer des sites qui seront plus accessibles à des facteurs de transcription [Lorch *et al.*, 2006]. Le mécanisme par lequel un nucléosome est inséré dans la chromatine ou en est éjecté, reste encore très peu connu. Néanmoins, il semble que les protéines chaperonnes des histones soient essentielles aux processus et que le nucléosome éjecté ne soit pas celui directement attaché au complexe mais plutôt un nucléosome adjacent [Dechassa *et al.*, 2010].

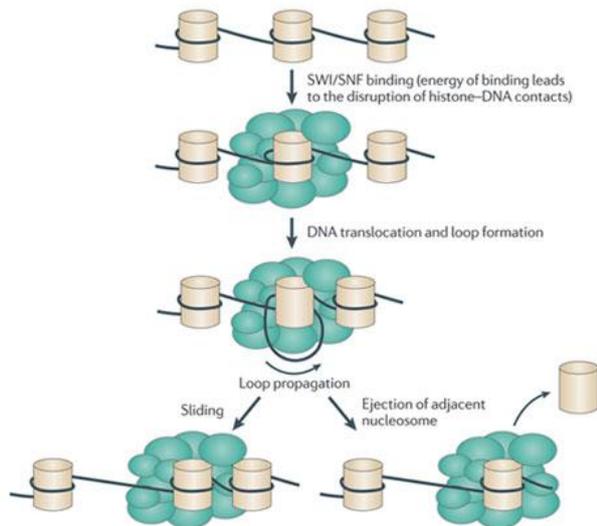


Figure 18: Mécanisme de remodelage de la chromatine par les complexes de la famille SWI/SNF. Les étapes de ce mécanisme incluent la fixation du complexe sur la chromatine puis la déstabilisation des contacts ADN-histone, la formation d'une boucle d'ADN qui se propage autour du nucléosome de manière à repositionner par glissement le nucléosome. Ce mouvement par glissement peut également aboutir à l'éjection d'un nucléosome adjacent [Wilson et Roberts, 2011].

D'une manière générale, les facteurs de remodelage de la famille SWI/SNF sont considérés comme des activateurs de la transcription mais il a été démontré dans plusieurs études que ces derniers peuvent également réguler négativement l'expression des gènes.

B. La famille ISWI (Imitation switch)

Identifiée chez la mouche, *Drosophila melanogaster*, la protéine ISWI présente de fortes similitudes avec la protéine SWI2/SNF2p que l'on retrouve dans les complexes de remodelage de la famille SWI/SNF. Cette protéine est caractéristique des complexes de la famille ISWI et représente leur sous-unité ATPase. Elle présente un domaine ATPase bien conservé qui contient les domaines DExx et HELICc. Cette sous-unité possède également en position C-terminale un domaine SANT (Swi3 Ada2 N-CoR TFIIIB) et un domaine SLIDE (SANT-like ISWI) importants dans la reconnaissance du substrat en permettant l'interaction du complexe avec l'ADN enroulé autour du nucléosome mais aussi avec la queue N-terminale de l'histone H4 (Fig 19). Cette interaction avec l'histone H4 est critique pour l'activité des complexes de la famille ISWI [Clapier *et al.*, 2001]. Ces complexes possèdent un nombre plus faible de sous-unités (de 2 à 4) en comparaison avec ceux de la famille des complexes SWI/SNF (supérieur à 9). Ces sous-unités additionnelles sont également importantes pour favoriser une interaction spécifique avec l'ADN ou les histones.



Figure 19: Organisation des domaines fonctionnels de la sous unité ATPase des membres de la sous famille ISWI. Cette sous-unité est composée d'un domaine DExx et HELICc, séparés par une petite insertion, qui sont responsables de l'activité ATPasique. Les membres de la famille ISWI possèdent également un domaine SANT et SLIDE qui sont importants pour leur fixation aux histones [Tang *et al.*, 2010].

Chez la drosophile, les complexes NURF (Nucleosome Remodeling Factor), CHRAC (Chromatin Remodeling and Assembly Complex) et ACF (ATP-utilizing Chromatin remodeling and assembly Factor) ont été caractérisés comme étant des complexes de remodelage de la chromatine qui présentent la protéine ISWI comme sous-unité ATPase [Tsukiyama et Wu, 1997]. Seules les sous-unités additionnelles diffèrent dans ces trois complexes, leur conférant ainsi des activités différentes. Chez la levure, les complexes ISW1 et ISW2 présentent une sous-unité ATPase caractérisée par la présence des protéines Isw1 et Isw2 respectivement. Ces deux protéines sont des homologues de la protéine ISWI identifiée chez la drosophile.

In vitro, il a été montré que les complexes CHRAC, ACF et ISW2 sont capables de moduler la position du nucléosome sur l'ADN alors que les complexes NURF et ISW1 sont dépourvus de cette activité [Längst et Becker, 2001 ; Varga-Weisz *et al.*, 1997] Il semble donc qu'une même sous-unité ATPase peut catalyser différentes réactions en fonction des sous-unités additionnelles qui vont composer le complexe dans lequel elle s'intègre.

Chez l'homme, hSNF2h et hSNF2hL sont des homologues de la protéine ISWI de la drosophile. Ces sous-unités ATPases sont présentes dans les complexes de remodelage hWCRF (Williams syndrome Chromatin Remodeling Factors), hCHRAC, hRSF (Remodeling and Spacing Factor) et mNoRC (Nucleolar Remodeling Complex) [Tsukiyama et Wu, 1997].

D'une manière générale, les complexes de remodelage de la chromatine de la famille ISWI sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires comme la réplication et la réparation de l'ADN, la régulation de la transcription des gènes (activation/répression) et dans le maintien de la structure des chromosomes.

C. La famille NURD/Mi2/CHD (Chromodomain-Helicase-DNA-binding)

Les complexes de remodelage de la famille NURD/Mi2/CHD possèdent une sous-unité ATPase, NURD/Mi2, semblable aux protéines de la famille CHD (Chromodomain Helicase DNA-binding) de la superfamille SNF2 des ATPases. Leur sous-unité est

caractérisée par la présence des domaines DExx et HELICc et de deux chromodomains (Fig 20). Généralement, les protéines contenant des chromodomains sont associées à la formation de l'hétérochromatine [Jones *et al.*, 2000] et sont impliquées dans la fixation aux histones méthylées [Eissenberg, 2012].



Figure 20: Organisation des domaines fonctionnels de la sous-unité ATPase des membres de la sous-famille CHD1. Cette sous-unité est composée d'un domaine DExx et d'un domaine HELICc, séparés par une petite insertion. Les membres de la famille CHD possèdent également deux chromodomains organisés en tandem et importants pour la fixation aux histones [Tang *et al.*, 2010].

Ces complexes ont la particularité de posséder, en plus de leur sous-unité ATPase, des sous-unités aux activités désacétylase et déméthylase favorisant la répression de la transcription des gènes [Zhang *et al.*, 1999]. D'autres sous-unités permettent le ciblage du complexe de remodelage au nucléosome et aux histones et plus précisément au niveau des sites méthylés de l'ADN. A l'inverse des autres facteurs de remodelage, les complexes de la famille NURD/Mi2/CHD ne se fixent pas directement au nucléosome mais *via* un facteur de transcription accroché à l'ADN.

D. La famille INO80 (Inositol auxotroph 80)

Les complexes de la famille INO80 présentent une sous-unité ATPase semblable à celle que l'on retrouve dans les complexes de la famille SWI/SNF. Néanmoins, dans ces complexes, les domaines DExx et HELICc sont séparés par une longue insertion qui est impliquée dans la fixation de sous-unités essentielles à leur activité ATPasique (Fig 21). Leur sous-unité ATPase présente également un domaine HSA, impliqué dans la fixation de l'actine.



Figure 21: Organisation des domaines fonctionnels de la sous-unité ATPase des membres de la sous-famille INO80. Cette sous-unité est composée d'un domaine DExx et d'un domaine HELICc séparés par une grande insertion qui est essentielle à son activité ATPasique. Les membres de la famille INO80 possèdent également un domaine HSA qui est important pour leur fixation à l'actine [Tang *et al.*, 2010].

Ces complexes, conservés de la levure jusqu'à l'homme, sont impliqués dans la réplication de l'ADN, la transcription des gènes et la réparation de l'ADN en altérant l'accessibilité à l'ADN au sein de la chromatine.

3.2 Les variants d'histones

Après s'être intéressés aux facteurs de remodelage de la chromatine qui ciblent plus particulièrement le nucléosome, nous allons nous focaliser sur la modification des histones et, dans un premier temps, sur les variants d'histones. Ce mécanisme épigénétique présente également un rôle dans la modification de l'état de condensation de la chromatine et, par conséquent, dans la transcription des gènes.

Les histones, qui sont parmi les protéines les plus conservées chez les eucaryotes, possèdent des isoformes que l'on nomme, variants d'histones. Connus depuis 1969, ces variants présentent une structure similaire aux histones conventionnelles H2A, H2B, H3 et H4 avec un domaine de repliement qui contient trois hélices- α séparées par deux boucles.

Les variants d'histones peuvent être regroupés dans deux classes différentes en fonction de leur homologie de séquence avec les histones conventionnelles [Perche *et al.*, 2003]. Ainsi, on distingue:

- Les variants d'histones homéomorphes, dont la séquence protéique ne diffère que de quelques acides aminés avec leurs homologues conventionnels, sans affecter leur mobilité électrophorétique.
- Les variants hétéromorphes, qui présentent à leur extrémité une séquence protéique plus variable affectant leur mobilité électrophorétique.

Synthétisés tout au long du cycle cellulaire, les variants d'histones sont incorporés au sein du nucléosome par des complexes spécifiques indépendamment de la phase de réplication de l'ADN. Le mécanisme d'assemblage de ces variants ne sera pas détaillé ici. Néanmoins, il semble que certains complexes de remodelage de la chromatine soient impliqués dans l'assemblage des variants d'histones.

Au sein des nucléosomes, les substitutions des histones H2A et H3 par des variants d'histones sont les plus fréquentes. A ce jour, aucun variant de l'histone H4 n'a été identifié et seuls quelques variants sont décrits pour les histones H1 et H2B. Ces derniers seraient impliqués dans le processus de la spermatogénèse [Seyedin et Kistler, 1980].

A. Les variants de l'histone H2A

Parmi les quatre histones conventionnelles qui composent le cœur du nucléosome, l'histone H2A est la seule dont l'extrémité C-terminale s'étend au-delà de son domaine *histone fold*. Les variants de l'histone H2A présentent une séquence de leur domaine *histone fold*

conservée avec l'histone H2A, mais ils ont une séquence très variable au niveau de leur extrémité C-terminale. Cette différence pourrait donc avoir un rôle essentiel dans la spécialisation fonctionnelle des variants de l'histone H2A. Parmi les sept variants de l'histone H2A, nous allons nous intéresser aux trois variants majeurs: H2A.X, H2A.Z et macro H2A.

- **Le variant H2A.X**

Retrouvée chez tous les eucaryotes, l'histone H2A.X peut subir, au sein des cellules, des modifications post-traductionnelles essentielles à son activité. Ainsi, il a été montré que la forme phosphorylée du variant H2A.X (plus connue sous le nom de γ H2A.X) est impliquée dans la reconnaissance et la réparation des coupures double brins de l'ADN. En plus de cette activité, il a été montré que le variant γ H2A.X est également impliqué dans la modification de la structure de la chromatine. En effet, chez le xénope, l'inhibition de la phosphorylation du variant H2A.X modifie l'enchaînement régulier des nucléosomes perturbant ainsi la structure de la fibre chromatinienne [Kleinschmidr *et al.*, 1991].

- **Le variant H2A.Z**

Le variant H2A.Z, exprimé tout au long du cycle cellulaire, joue un rôle important dans la viabilité de certains organismes comme *Tetrahymena* [Allis *et al.*, 1980], *Drosophila* [Clarkson *et al.*, 1999] ou la souris [Faast *et al.*, 2001]. Ce variant est impliqué dans la ségrégation des chromosomes pendant la mitose et sa suppression par ARN interférence (ARNi) dans des cellules humaines ou de souris entraîne une déstabilisation du génome [Rangasamy *et al.*, 2008]. De plus, il a été montré que le variant H2A.Z présente une fonction importante au cours du développement car sa suppression dans des embryons de drosophile ou dans des ovocytes de xénope entraîne des défauts majeurs de développement voire des effets létaux [Ridgway *et al.*, 2004].

La structure cristallographique d'un nucléosome ayant incorporé le variant H2A.Z ne présente pas de différence structurale majeure avec un nucléosome conventionnel. Néanmoins, certains acides aminés spécifiques du variant H2A.Z sont capables de déstabiliser la structure du nucléosome et de la fibre chromatinienne pour permettre le recrutement de la machinerie transcriptionnelle [Suto *et al.*, 2000]. A l'inverse, chez la drosophile, il a été montré que le variant H2A.Z se retrouve enrichi au niveau de l'hétérochromatine facultative, suggérant également un rôle de celui-ci dans la répression de la transcription des gènes.

- **Le variant macroH2A**

Le variant macroH2A possède un domaine conservé avec l'histone H2A en position N-terminale (identité de 64%) [Pehrson *et al.*, 1992]. Néanmoins, il se distingue des autres variants de l'histone H2A par la présence d'un macro-domaine de 30 KDa en position C-terminale. Les nucléosomes qui contiennent le variant macroH2A présentent de fortes similarités de structure et des propriétés biochimiques semblables aux nucléosomes conventionnels. Cependant, il existe des différences importantes dans la boucle L1 du domaine *histone fold* du variant macroH2A qui favorisent la formation de nucléosomes contenant à la fois un variant macroH2A et l'histone H2A conventionnelle [Chakravarthy et Luger, 2006]. La présence de macroH2A dans le nucléosome empêche le glissement de l'octamère d'histones par les facteurs de remodelage de la famille SWI/SNF [Angelov *et al.*, 2003].

Les premières études menées sur le variant macroH2A ont montré qu'il est localisé au niveau de la région nucléaire occupée par le chromosome X inactif chez les femelles mammifère. Cette localisation suggère un rôle de ce variant dans la répression de l'expression des gènes [Costanzi et Pehrson, 1998]. De plus, par des expériences *in vitro*, il a été démontré que la présence du macro-domaine à proximité du promoteur d'un gène rapporteur conduit à une répression de son expression [Vourc'h *et al.*, 2000]. *In vivo*, il a été montré que l'extrémité C-terminale de macroH2A pourrait être impliquée dans la formation de l'hétérochromatine en recrutant des HDAC(s) de classe I [Chakravarthy *et al.*, 2005].

B. Les variants de l'histone H3

Chez l'homme, huit variants de l'histone H3 ont été identifiés [Kurumizaka *et al.*, 2012]. Seuls les rôles des variants CENP-A, H3.1, H3.2 et H3.3, qui sont les plus abondants dans les cellules mammifères, seront détaillés dans cette partie.

- **Le variant CENP-A (Centromere Protein A)**

Par contraste avec les autres variants d'histones, CENP-A a évolué rapidement. Il est ainsi très peu conservé entre les espèces, notamment au niveau de sa région N-terminale qui varie en taille et en séquence. Il ne partage que 50% d'identité avec l'histone H3 conventionnelle [Yoda *et al.*, 2000]. Cependant, malgré ces différences de séquence peptidique entre les espèces, le variant CENP-A est retrouvé essentiellement localisé au niveau des centromères chez tous les eucaryotes et est essentiel à leur structure ainsi qu'à leurs fonctions [Palmer *et al.*, 1987]. La présence de ce variant au sein des nucléosomes va

également assurer, par le biais de recrutement de protéines spécifiques, la formation du kinétochore qui est essentiel à la ségrégation des chromosomes pendant la mitose [Van Hooser *et al.*, 2001].

- **Les variants H3.1 et H3.2 et H3.3**

Les variants H3.1 et H3.2 présentent une séquence peptidique identique entre eux à l'exception de la substitution d'une cystéine par une sérine en position 96. Ils sont associés à l'hétérochromatine et sont dits strictement dépendants de la réplication et ne seront synthétisés et incorporés à la chromatine que pendant la phase S du cycle cellulaire. A l'inverse, le variant H3.3, qui ne diffère que de 4 et 5 acides aminés avec H3.1 et H3.2 respectivement, est associé à l'euchromatine et est incorporé aux nucléosomes tout au long du cycle cellulaire. Le variant d'histone H3.1 est incorporé au sein du nucléosome par une protéine chaperonne des histones CAF-1 (Chromatine Assembly Factor 1) [Kaufman *et al.*, 1995] alors que le variant H3.3 est incorporé via un régulateur des histones HIRA (Histone regulator A) [Ray Gallet *et al.*, 2002].

3.3 Les modifications post-traductionnelles des histones

Après nous être intéressés à la modification des histones par l'incorporation de variants d'histones dans le cœur du nucléosome, nous allons aborder les modifications post traductionnelles de ces protéines.

Les histones sont caractérisées par la présence d'un domaine C-terminal globulaire qui constitue le cœur du nucléosome. Au niveau de leur extrémité N-terminale, ces protéines présentent une queue non structurée qui se retrouve exposée à la surface du nucléosome et majoritairement sujette à des modifications post-traductionnelles. Ces modifications, comme nous allons le voir, ont un rôle important dans la régulation de la transcription des gènes, la réparation et la réplication de l'ADN ainsi que dans la condensation des chromosomes.

Les modifications post traductionnelles sont covalentes et de plusieurs natures. Ainsi, toutes les histones peuvent être modifiées simultanément en étant acétylées, méthylées, phosphorylées, ubiquitinyllées, ADP-ribosylées et/ou sumoylées sur différents résidus (Fig 22 et Tableau 1).

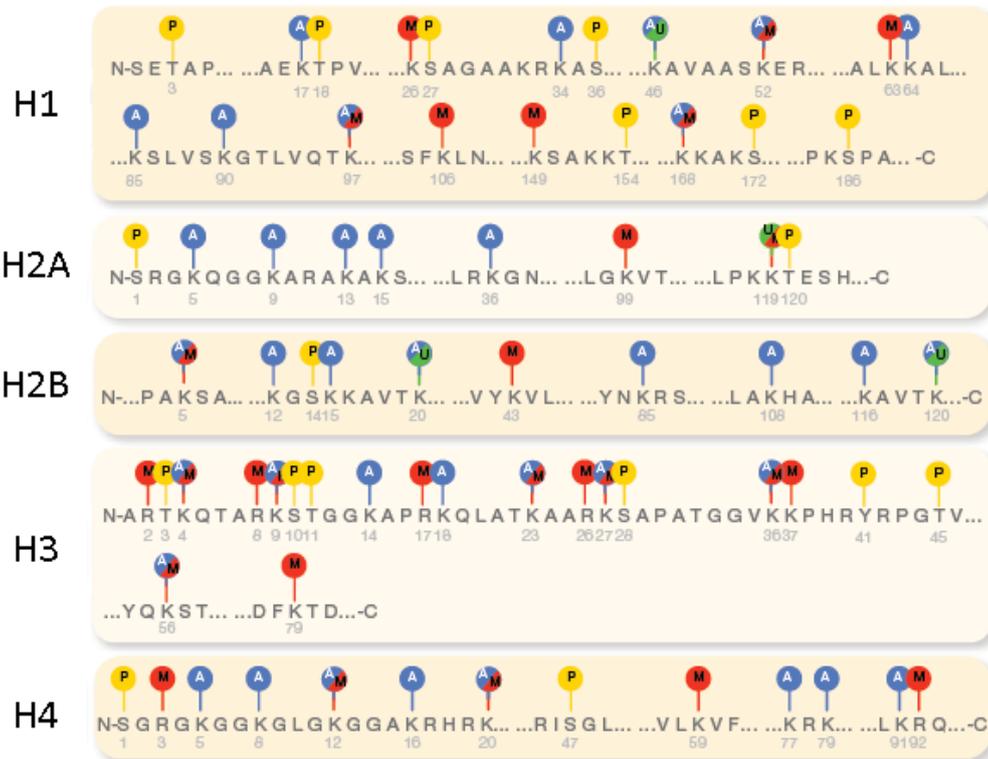


Figure 22: Les différentes modifications post-traductionnelles des histones. Toutes les histones sont sujettes à des modifications post-traductionnelles qui s'opèrent généralement au niveau de leur extrémité N-terminale. Les principales modifications post-traductionnelles sont indiquées dans la figure: acétylation (bleue), méthylation (rouge), phosphorylation (jaune) et ubiquitylation (vert). Les nombres indiqués en gris sous chaque acide aminé correspondent à leur position respective dans la séquence [Portela *et al.*, 2010].

Chromatin Modifications	Residues Modified	Functions Regulated
Acetylation	K-ac	Transcription, Repair, Replication, Condensation
Methylation (Lysines)	K-me1 K-me2 K-me3	Transcription, Repair
Methylation (Arginines)	R-me1 R-me2 R-me3	Transcription
Phosphorylation	S-ph T-ph	Transcription, Repair, Condensation
Ubiquitylation	K-ub	Transcription, Repair
Sumoylation	K-su	Transcription
ADP ribosylation	E-ar	Transcription

Tableau 1: Les différentes modifications post-traductionnelles des histones. Les résidus modifiés ainsi que les fonctions associées à ces modifications sont indiquées [D'après Kouzarides, 2007].

De plus, il existe une interdépendance, autrement dit, une communication entre ces différentes modifications. En effet, une modification sur un site donné peut influencer la capacité d'un autre site à être modifié de manière synergique ou antagoniste. L'ensemble de ces modifications et leurs interdépendances ont conduit à proposer un code des histones [Jenuwein et Allis, 2001].

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses équipes de recherche s'attèlent à étudier l'impact de ces modifications sur la régulation de l'expression de gènes. Ainsi, d'un point vu très général, l'euchromatine, état de condensation de la chromatine où la transcription des gènes est active, est caractérisée par un niveau élevé d'acétylation et de tri-méthylation des histones sur les lysines H3K4, H3K36 et H3K79 (Fig 23). A l'inverse, l'hétérochromatine, état de condensation de la chromatine où la transcription des gènes est inactive, est caractérisée par un niveau faible d'acétylation des histones et un niveau élevé de méthylation des histones sur les lysines H3K9, H3K27 et H4K20 (Fig 23) [Li *et al.*, 2007]. Plus récemment, il a été démontré que l'étude des niveaux de modifications des histones permettait de prédire l'expression d'un gène. De cette manière, un gène transcrit activement est caractérisé par un niveau élevé de H3K4me3, H3K27ac, H2BK5ac et H4K20me1 au niveau de son promoteur et d'un niveau élevé de H3K79me1 et H4K20me1 tout au long du gène [Karlic *et al.*, 2010].

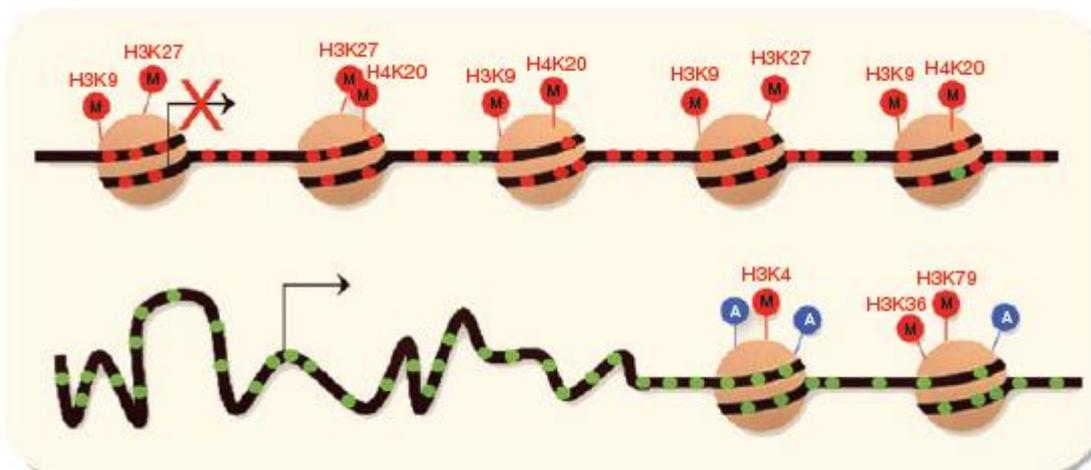


Figure 23: Modifications post-traductionnelles des histones et position des nucléosomes dans la régulation de la transcription. La position des nucléosomes joue un rôle important dans la régulation de la transcription des gènes. Les gènes transcriptionnellement actifs possèdent une région en 5' dépourvue en nucléosome permettant d'augmenter l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN. L'absence de nucléosome sur le site d'initiation de la transcription est nécessaire pour activer le gène [Portela *et al.*, 2010].

Les modifications post-traductionnelles des histones sont des mécanismes réversibles et dynamiques. Ainsi, de nombreuses enzymes impliquées dans l'ajout ou la suppression de ces modifications sont décrites.

Nous allons maintenant nous focaliser sur les modifications des histones les plus fréquemment rencontrées: la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation et l'acétylation.

A. La méthylation des histones

La méthylation des histones a lieu essentiellement au niveau des résidus lysine et arginine des extrémités N-terminales des histones H3 et H4. *In vivo*, les résidus lysine peuvent être mono-, di- ou triméthylés alors que les résidus arginine n'existent que sous la forme mono- ou diméthylés [Zhang et Reinberg, 2001]. Généralement, la méthylation des résidus arginine est associée à une activation de la transcription tandis que celle des résidus lysine est associée à l'activation ou à la répression transcriptionnelle en fonction du contexte.

A l'inverse des autres modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation des histones, la méthylation ne régule pas directement l'expression des gènes en altérant la charge électrostatique des résidus qu'elle cible mais aurait plutôt un effet antagoniste ou synergique sur d'autres modifications post-traductionnelles. Cette modification peut être également reconnue par certains effecteurs, comme les facteurs de remodelage de la chromatine de la famille NURD/Mi2/CHD *via* leur chromodomaine.

Les Histones Méthyltransférases (HMT) catalysent la réaction de transfert d'un groupement méthyle provenant d'une méthionine-S-adenosyl vers un groupement ϵ -amino terminal des résidus lysine ou arginine (Fig 24).

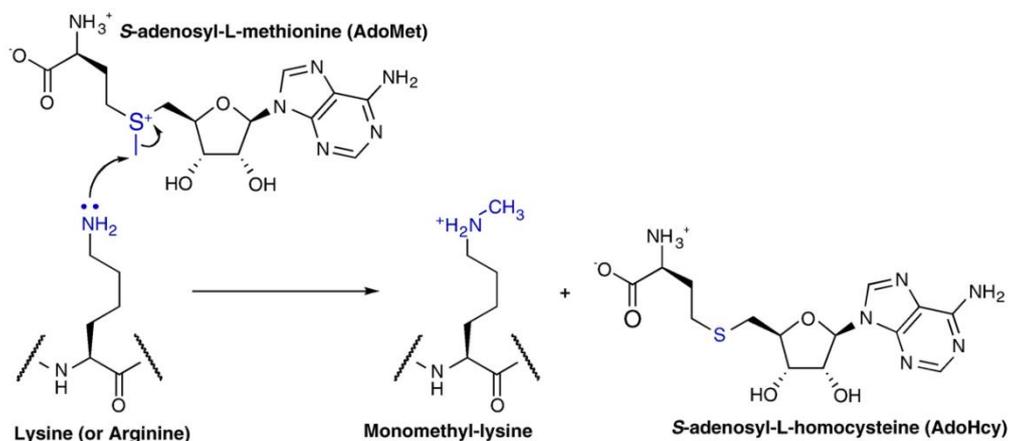


Figure 24: Mécanisme d'action des histones méthyltransférases [Smith et Denu, 2009].

Les HMT peuvent être classées en trois familles. La première famille regroupe les HMT(s) qui possèdent un domaine catalytique conservé, appelé SET (Suppressor of variegation, Enhancer of zeste, Trithorax) qui sont spécifiques des lysines [Rea *et al.*, 2000]. Dans le génome humain, plus de 60 protéines possèdent un domaine SET, néanmoins il a été montré que ces enzymes n'ont pas toutes une activité déméthylase. Dans la deuxième famille, la famille Dot1/KMT4 on regroupe les enzymes qui sont également spécifiques des résidus lysines mais qui ne présentent pas un domaine SET [Feng *et al.*, 2002]. Il a été

démonstré que ces enzymes, sont capables de méthyler la lysine 79 de l'histone H3 présente dans la particule cœur du nucléosome. Enfin, on regroupe dans la famille des PRMT (Protein arginine méthyltransferases) les HMT(s) spécifiques des résidus arginine [Bannister et Kouzarides, 2011]. Chez les mammifères, neuf membres de cette famille ont été identifiés (PRMT1-9). Le tableau ci-dessous présente les principales HMT identifiées chez l'homme ainsi que leurs substrats et leurs fonctions associées.

Family	HMT	Specificity	Function
PRMT	PRMT1	H4-R3 (non-histone proteins)	Transcriptional activation (signal transduction, etc)
	PRMT2	Unknown	Coactivator of estrogen receptor
	PRMT3	Unknown	Cytoplasmic (mitose?)
	PRMT4/CARM1	H3-R2, -R17, -R26	Transcriptional coactivateur
	PRMT5	H2A, H4 (non-histone proteins)	Transcriptional repressor and spliceosome formation
SET domain	Suv39H1	H3-K9	Heterochromatin formation, silencing
	Suv39H2	H3-K9	Heterochromatin formation, silencing
	G9a	H3-K9, -K27	Early embryogenesis role, transcriptional repression
	ASH1	H3K4, -K9, H4-K20	Establishment of epigenetic, active transcription patterns
	Set1	H3-K4	Silencing
	Set2	H3-K36	Silencing, transcription
	Set7	H4-K20	Development, silent chromatin, Involved in aging
	Set9	H3-K4	Transcriptional activation
	ESC-E(z)	H3-K27	Polycomb-mediated silencing
SETDB1	H3-K9	Silencing-mediated by the corepressor KAP-1	
Dot	Dot1	H3-K79	Silencing by precluding Sir binding to bulk chromatin

Tableau 2: Les Histones méthyltransférases. Résumé des principales HMT identifiées chez l'homme, les résidus des histones qu'elles modifient ainsi que leurs fonctions biologiques associées [D'après Vaquero *et al.*, 2003].

La méthylation des histones a longtemps été considérée comme une modification post traductionnelle irréversible et stable [Bannister *et al.*, 2002]. Néanmoins, en 2004, Shi et son équipe identifie la première déméthylase, LSD1 (Lysine Specific Demethylase1), qui catalyse la déméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 en formant du formaldéhyde et en utilisant comme cofacteur la FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) (Fig 25) [Shi *et al.*, 2004].

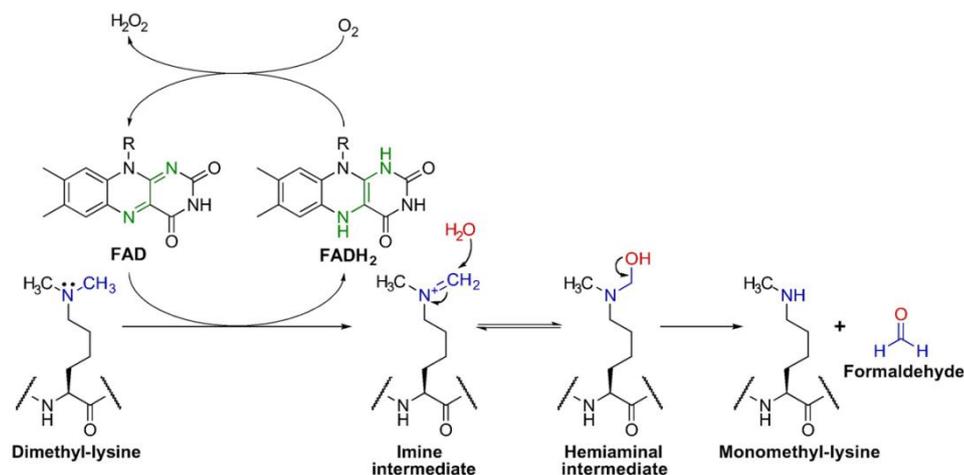


Figure 25: Mécanisme d'action des déméthylases [Smith et Denu, 2009].

A la suite de cette découverte, en 2006, Tsukada *et al.* identifient une seconde famille dont les histones déméthylases contiennent toutes un domaine jumonji C essentiel à leur activité. Ces enzymes, appelées JHDM(s) (Jumonji Histone Demethylases), catalysent la déméthylation des lysines triméthylées des extrémités N-terminales des histones [Tsukada *et al.*, 2006]. Ces enzymes sont conservées de la levure jusqu'à l'homme et environ 30 membres ont été identifiés chez l'humain. Par ailleurs, un seul mécanisme de déméthylation des résidus arginine est connu à ce jour. Il fait intervenir des PAD (Protein Arginine Déaminases) qui catalysent l'hydrolyse d'un groupement guanidium des arginines pour former de la citrulline et de l'ammoniac [24.25]. Chez l'homme, 5 PAD ont été identifiées (PAD1-4 et PAD6) [Smith et Denu, 2009].

B. La phosphorylation des histones

Les histones sont phosphorylées au niveau de leurs extrémités N-terminales sur les résidus sérine, thréonine et tyrosine. Toutes les histones présentent ces sites accepteurs qui peuvent être phosphorylés par des protéines kinases et déphosphorylés par des protéines phosphatases. Bien qu'un grand nombre de ces résidus phosphorylés soit décrit, l'identification de nouveaux sites et la caractérisation de leurs fonctions biologiques font l'objet d'investigations intensives.

La phosphorylation des histones est associée à de nombreux processus cellulaires comme la régulation de la transcription des gènes, l'apoptose, la progression du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la condensation des chromosomes et la régulation des gènes au cours du développement.

Dans la majorité des cas, la phosphorylation des résidus sérine et thréonine est impliquée dans la condensation de la chromatine pendant la mitose et la méiose. Par exemple, chez la drosophile, la phosphorylation de la thréonine 119 de l'histone H2A permet de réguler la structure et la fonction de la chromatine pendant la mitose [Aihara *et al.*, 2004]. De plus, il a été montré que la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 entraîne une compaction de la chromatine pendant la mitose et la méiose dans plusieurs organismes eucaryotes [Wei *et al.*, 1998 ; De la Barre *et al.*, 2000]. Comme nous l'avons vu précédemment, le variant d'histone H2AX peut être phosphorylé sur la sérine 139 (γ H2AX) lorsque l'ADN double brin est clivé permettant ainsi de recruter sur ce résidu des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN [Rogakou, 1998].

La phosphorylation des histones a souvent lieu en combinaison avec d'autres modifications post-traductionnelles et va aboutir, en fonction du contexte, à de nombreux effets

biologiques. Les résidus d'histones, connus pour être phosphorylés *in vivo* ainsi que leurs implications dans différents processus cellulaires sont présentés dans le Tableau 3.

Histone	Residue	Kinases	Role
H2A	S1	?	Mitosis
	S16	RSK2	EGF signaling
	T120	Bub1	DNA repair/mitosis/meiosis
	S139(H2AX)	ATM, ATR, DNA-PK	DNA repair
	Y142 (H2AX)	Mst1	Apoptosis
	Y142 (H2AX)	WST	DNA repair
H2B	S14	Mst1	Apoptosis
	S14	?	Meiosis
	S32	RSK2	EGF signaling
	S36	AMPK	Transcription
	Y37	WEE1	Transcription
H3	T3	Haspin	Mitosis
	T6	PKC β	Transcription
	S10	AuroraB, RSK2, ERK1, Chk1	Transcription, chromatin condensation, UVB reponse
	T11	Dlk	Mitosis
	T11	PRK1, PKM2	Transcription
	T11	Chk1	DNA damage response
	S28	AuroraB, ERK1/2, p38	Meiosis
	S28	MLTK- α , JNK1/2, MSK1	Mitosis, Transcription
	Y41	JAK2	Transcription
T45	PK-C δ	Apoptosis	
H4	S1	CKII	DNA repair, Transcription
	S1	Sps1	Meiosis, transcription
	S47	PAK2	(H3.3-H4) deposition
H1	S/T	CDK2	Mitosis, Transcription

Tableau 3: La phosphorylation des histones. Résumé des différents résidus des histones phosphorylés *in vivo* chez l'homme avec les kinases responsables de ces modifications et leurs rôles biologiques associés [D'après Rossetto *et al.*, 2012].

C. L'ubiquitinylation des histones

L'ubiquitinylation est une modification post-traductionnelle qui touche spécifiquement la lysine 129 de l'histone H2A et la lysine 120 de l'histone H2B chez l'homme [West et Bonner, 1980]. Cependant, il est rapporté dans la littérature que l'histone H1 [Pham et Sauer, 2000], ainsi que le domaine C-terminal de l'histone H3 [Chen *et al.*, 1998], peuvent être modifiés par ubiquitinylation. Chez les vertébrés, au sein du noyau des cellules, on estime que 5 à 15% des histones H2A et que 1 à 2 % des histones H2B sont ubiquitinyliées [Goldknopf *et al.*, 1975].

D'un point de vue général, l'ubiquitinylation des histones joue un rôle critique dans la régulation de la transcription et dans la réparation de l'ADN. Des expériences

d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont montré que les régions satellites du génome sont enrichies en histone H2A ubiquitinylées (H2Aub) alors que les histones H2B ubiquitinylées (H2Bub) sont retrouvées majoritairement au niveau des gènes qui sont transcrits [Zhu *et al.*, 2011 ; Minsky *et al.*, 2008]. H2Aub est fréquemment corrélée avec une répression de la transcription alors que H2Bub est généralement associée avec une activation de la transcription (Tableau 4). Concernant la réparation de l'ADN, il a été démontré que la polyubiquitinylation de la lysine 63 de l'histone H2A, ou de son variant H2A.X, était induite par des dommages au niveau de l'ADN et qu'elle était importante dans le processus de réparation [Kolas *et al.*, 2007 ; Doil *et al.*, 2009]. De plus, comme pour d'autres protéines, la polyubiquitinylation des histones entraîne leur dégradation par le protéasome et semble essentielle pendant la spermatogénèse pour permettre la condensation de la chromatine [Liu *et al.*, 2005].

Chez l'homme, RING1A est la première ubiquitine ligase (E3) qui ait été identifiée comme étant responsable de la monoubiquitinylation de l'histone H2A sur sa lysine 119 [Cao *et al.*, 2005]. Identifiée chez la levure, Rad6, une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2) et Bre1, une ubiquitine ligase (E3) sont responsables de la monoubiquitinylation de l'histone H2B [Robsyk *et al.*, 2000 ; Wood *et al.*, 2003]. Chez l'homme deux homologues ont été identifiés, il s'agit de RNF20 (E2) et de RNF40 (E3) (Fig 26) [Koken *et al.*, 1991].

Comme pour les autres modifications des histones, la monoubiquitinylation des H2A et H2B est un mécanisme réversible. La réaction de suppression d'un groupement ubiquitine est catalysée par des protéases spécifiques connues sous le nom de DUB (Deubiquitinating enzymes).

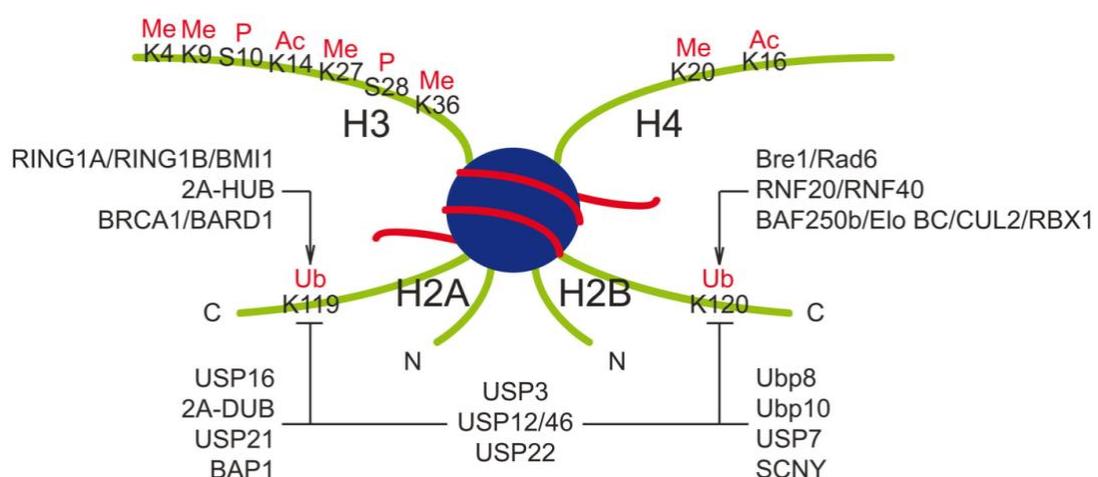


Figure 26: Enzymes impliquées dans l'ubiquitinylation et la désubiquitinylation des histones H2A et H2B. Les modifications post-traductionnelles des extrémités N-terminales des histones H3 et H4 sont également indiquées: acétylation (Ac), méthylation (Me) et phosphorylation (P) [Cao et Yan, 2012].

Enzyme	Histone specificity	Enzymatic activity	Role in transcription
RING1A/RING1B/BMI1	H2A	E3	Repression
2A-HUB	H2A	E3	Repression
BRCA1/BARD1	H2A	E3	Repression
UbcH5c	H2A	E2	N/A
RNF20/40	H2B	E3	Activation
RAD6A/B	H2B	E2	Activation
UbcH6	H2B	E2	Activation
USP16	H2A	DUB	Activation
USP21	H2A	DUB	Activation
2A-DUB	H2A	DUB	Activation
BAP1	H2A	DUB	Activation
USP3	H2A	DUB	Activation
USP22	H2A, H2B	DUB	Activation

Tableau 4: Fonction des enzymes modifiant les histones par monoubiquitinylation ou par désubiquitinylation [Cao et Yan, 2012].

4. Acétylation/Désacétylation des histones

4.1 L'acétylation des histones

L'acétylation des histones est la modification post-traductionnelle la plus étudiée à ce jour. Cette réaction est catalysée par des Histones Acetyl Transferase (HAT) qui transfèrent un groupement acétyl à partir de l'acétyl-coA vers l'extrémité amino-terminale des résidus lysine des histones (Fig 27) [Smith et Denu, 2009].

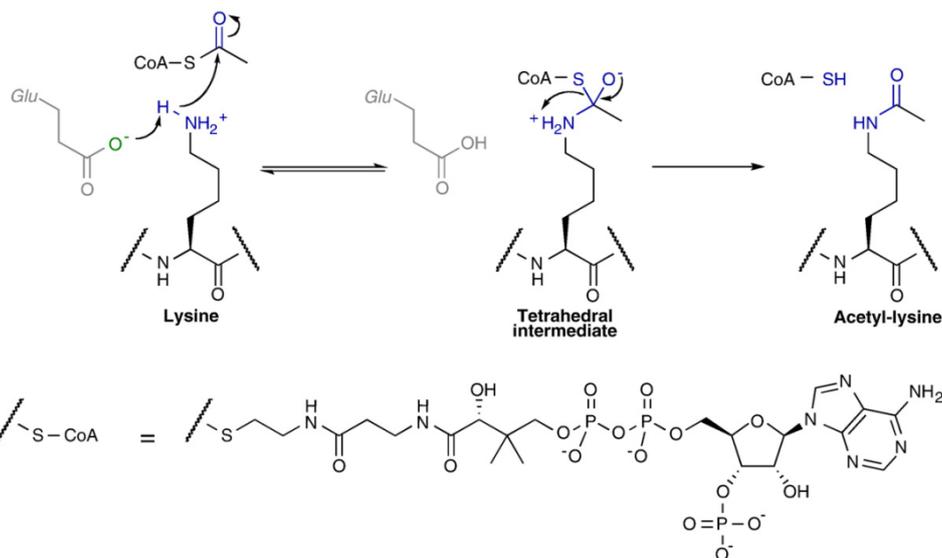


Figure 27: Mécanisme d'action des enzymes acétyltransférase [Smith et Denu, 2009].

L'acétylation des lysines entraîne une neutralisation de la charge positive des histones permettant de diminuer leur affinité avec l'ADN et d'altérer les interactions entre les nucléosomes. Ainsi, elle entraîne une modification de l'état de condensation de la chromatine. D'un point de vue général, l'acétylation des histones est impliquée dans la régulation de la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN. Elle est également un marqueur important pour la fixation des protéines qui contiennent des bromodomains.

On distingue deux grands types d'HAT: les HAT de type A et de type B [Bronwell et Allis, 1996]. Les HAT de type A sont localisées dans le noyau où elles vont acétyler à la fois les histones mais également d'autres protéines comme des facteurs de transcription ou des protéines de structure cellulaire. Les HAT de type B sont retrouvées dans le cytoplasme de la cellule où elles sont responsables de l'acétylation de protéines cytosoliques, comme la tubuline, et de celle des histones, nouvellement synthétisées avant d'être transloquées dans le noyau pour être assemblées à la chromatine pendant la réplication de l'ADN [Ruiz-Carrillo, 1975].

Les HAT de type A peuvent être regroupées en trois grandes familles en fonction de leur homologie de séquence peptidique et de la conservation de certains de leurs domaines.

A. La famille GNAT (GCN5-related N-Acetyl Transferase)

Les HAT de la famille GNAT sont caractérisées par la présence d'un domaine acétyl transférase (HAT) et par celle d'un bromodomaine à leur extrémité C-terminale. Le domaine HAT contient une séquence Arg/Gln-X-X-Gly-X-Gly/Ala, importante dans la reconnaissance et la fixation de l'acétyl-CoA [Dutnall *et al.*, 1998 ; Wolf *et al.*, 1998].

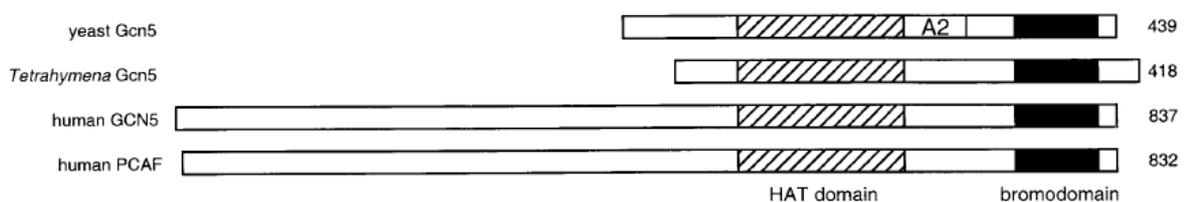


Figure 28: Alignement des domaines fonctionnels des protéines de la famille GNAT identifiées chez différents organismes. Les localisations des domaines HAT et du bromodomaine sont mentionnés. Le domaine A2 désigne une région de l'enzyme GCN5 chez la levure connue pour interagir avec la protéine adaptatrice Ada2 [Sterner et Berger, 2000].

La première HAT de la famille GNAT, à avoir été clonée et caractérisée, est p55 (55-kDa polypeptide) du protozoaire *Tetrahymena thermophila* [Brownell *et al.*, 1996]. L'analyse de sa séquence a permis de mettre en avant que p55 est très similaire à yGCN5, un co-

activateur de la transcription déjà identifié chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* [Georgakopoulos et Thieros, 1992]. D'autres protéines homologues à γ GCN5 ont été clonées et caractérisées chez l'homme [Candau *et al.*, 1996], la drosophile [Smith *et al.*, 1998], la souris [Xu *et al.*, 1998] suggérant ainsi que la fonction de ces enzymes est conservée chez les eucaryotes.

In vitro, GCN5 acétyle les histones H3 (K14) et H4 (K8/K16) lorsqu'elles sont sous leur forme libre [Kuo *et al.*, 1996]. L'activité acétyltransférase de GCN5 sur les histones du nucléosome n'est observée que dans certaines conditions et en présence d'une forte concentration d'enzyme [Tse *et al.*, 1998]. Cependant, associée à d'autres protéines, notamment dans les complexes SAGA et ADA, il a été montré que GCN5 acétyle efficacement les histones du nucléosome chez la levure.

Chez l'homme, la famille GNAT est représentée par deux protéines, GCN5 et P/CAF (p300/CBP-Associated Factor). Ces protéines partagent 75% d'identité et 80% de similarité entre elles [Xu *et al.*, 1998]. *In vitro*, P/CAF présente une activité acétyltransférase sur les histones H3K14 et H4K8 du nucléosome [Schiltz, 1999]. En plus de son activité sur les histones, P/CAF acétyle également d'autres protéines telles que p53 ou encore MyoD. P/CAF et GCN5 participent à des complexes et peuvent se fixer à une autre HAT p300/CBP pour participer à la régulation de la transcription ou contrôler le cycle cellulaire.

B. La famille p300/CBP

Dans cette famille d'HAT, on retrouve deux protéines majeures, p300 et CBP qui sont comme P/CAF, des co-activateurs de la transcription capables d'acétyler les histones du nucléosome mais aussi d'autres protéines. Ces deux protéines, fortement homologues entre elles présentent, comme les membres de la famille GNAT, un domaine HAT conservé ainsi qu'un bromodomaine (Fig 29A). De plus, elles possèdent trois domaines riches en cystéines et en histidines (CH1, CH2 et CH3), un domaine KIX ainsi qu'un domaine ADA-2 très similaire au co-activateur transcriptionnel Ada2p de la levure. Les domaines CH1, CH3 et KIX sont importants pour les interactions protéine-protéine alors que le bromodomaine serait impliqué dans la reconnaissance de résidus acétylés [Mujtaba *et al.*, 2007]. De nombreuses protéines telles que des facteurs de transcription, des récepteurs nucléaires ou des protéines virales peuvent se fixer à CBP et p300 pour former des complexes qui agissent comme des co-activateurs de la transcription (Fig 29B). Ainsi, ces deux protéines sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, la différenciation, l'apoptose et la régulation de la transcription [Chan et La Thangue, 2001].

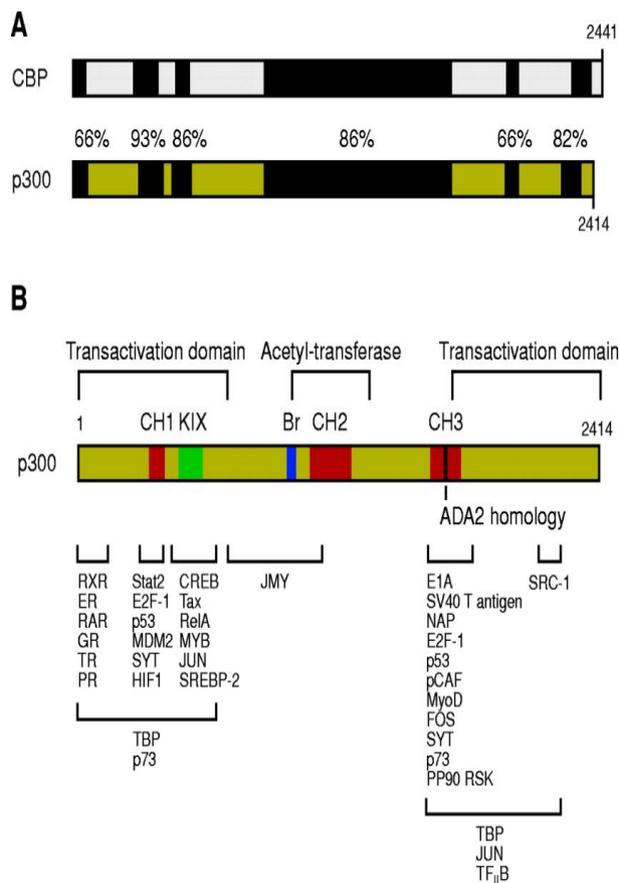


Figure 29: Organisation et comparaison des protéines p300 et CBP. (A) Comparaison de p300 et CBP. Les régions très homologues sont représentées en noir avec le pourcentage d'identité des acides aminés entre les deux séquences. (B) Organisation des domaines fonctionnels de p300. Les extrémités N- et C-terminales de p300/CBP peuvent agir comme des domaines de transactivation et le domaine acétyltransférase est localisé au centre de la protéine. Les protéines cibles de CBP/p300 ainsi que leur site de fixation sont également indiqués sur la figure [Chan et La Thangue, 2001].

A l'inverse des autres HAT, les enzymes p300 et CBP acétylent *in vitro* les extrémités N-terminales des histones H2A, H2B, H3 et H4 sans spécificité apparente. Comme pour P/CAF, l'activité HAT de p300 et CPB est régulée par d'autres facteurs. Par exemple, il a été montré que la fixation de la protéine virale E1A et de la protéine régulatrice Twist à p300 provoque l'inhibition de son activité HAT.

C. La famille MYST

Actuellement, chez l'homme, cinq HAT(s) de la famille MYST ont été identifiées: Tip60, MOZ, MORF, HBO1 et MOF. L'ensemble de ces membres est caractérisé par la présence d'un domaine MYST très conservé, responsable de l'activité acétyltransférase de ces enzymes. Ce domaine est composé d'une région capable de fixer l'acétyl-coA et d'un motif doigt de zinc. Certains membres de cette famille présentent, en plus du domaine MYST, des chromodomaines qui sont impliqués dans la fixation aux histones méthylées ainsi que des motifs PHD finger (Plant Homeo Domain) (Fig 30 A) [Utlely et Cote, 2003]. On retrouve essentiellement ces enzymes dans des complexes multiprotéiques (Fig 30B) où elles vont agir dans de nombreux processus cellulaires comme la régulation de la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN [Avvakumov et Côté, 2007].

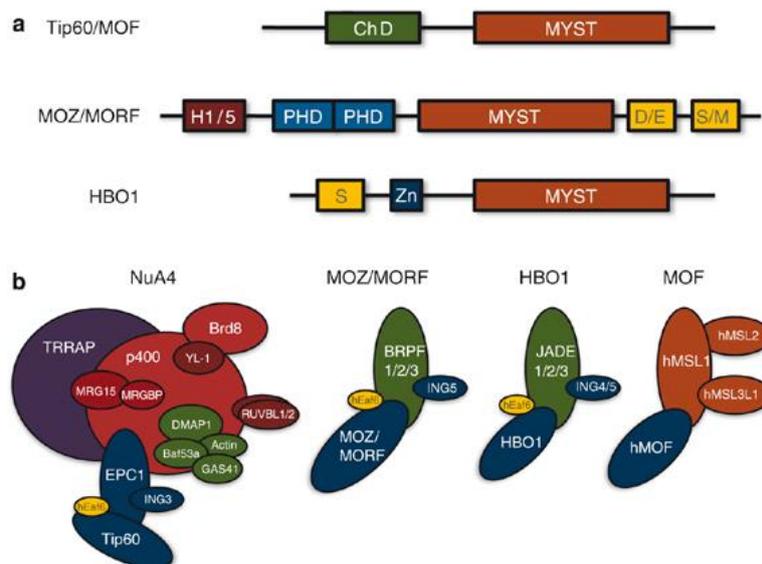


Figure 30: HAT(s) de la famille MYST et leurs complexes. (A) Représentation des domaines fonctionnels des HAT(s). ChD: Chromodomaine, MYST: Domaine MYST qui présente l'activité HAT, PHD: Plant homeodomain-linked zinc finger, Zn: Zinc finger et D/E, S/M région riche en résidus. (B) Les différentes sous-unités des complexes protéiques formés par les HAT de la famille MYST [Avvakumov et Côté, 2007].

La première HAT de la famille MYST qui a été décrite chez l'homme est Tip60 (HIV Tat-interactive protein, 60kDa) [Kamine *et al.*, 1996]. *In vitro*, Tip60 présente une activité acétyltransférase sur les histones H2A, H3 et H4 lorsqu'elles sont sous leur forme libre et dans une moindre mesure lorsque les histones sont sous la forme d'un octamère dans un nucléosome. Cette protéine est la sous-unité catalytique du complexe NuA4 (Nucleosome Acetyltransferase of histone H4) [Doyon *et al.*, 2004]. Il a été montré que Tip60 est impliquée dans la régulation de la transcription en fonctionnant comme un co-activateur pour de nombreuses protéines cellulaires telles que les récepteurs nucléaires [Brady *et al.*, 1999], la β -catenin [Sierra *et al.*, 2006] ou encore le facteur nucléaire NF- κ B [Baek *et al.*, 2002]. Des expériences d'ARN interférence ont permis de mettre en évidence que Tip60 est nécessaire pour induire l'apoptose [Berns *et al.*, 2004] notamment en acétylant p53 sur sa lysine 120 lorsque l'ADN est endommagé [Sykes *et al.*, 2006]. D'autres études ont montré que Tip60 est impliquée dans l'initiation du mécanisme de réparation de l'ADN en acétylant la protéine kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) [Sun *et al.*, 2005]. L'activation de ATM va initier une série de phosphorylations en cascade [Sancar *et al.*, 2004] et notamment celle de p53 qui, couplée avec l'acétylation par Tip60, provoque l'arrêt du cycle cellulaire ou induit l'apoptose.

HBO1 (Histone acetyltransferase Bound to ORC), une autre HAT de la famille MYST est connue pour exister dans deux complexes multiprotéiques très similaires. Ainsi, elle est impliquée dans la réplication de l'ADN en régulant positivement l'assemblage du complexe

de pré-réplication (pre-RC) pour permettre l'initiation de la transcription [Doyon *et al.*, 2006]. En effet, HBO1 serait impliquée dans l'acétylation d'une sous-unité de pré-RC mais aussi dans l'acétylation des histones du nucléosome permettant d'augmenter l'accessibilité à l'ADN [Iizuka *et al.*, 2006]. Plusieurs études ont également montré que HBO1 peut réguler la transcription en fonctionnant comme un co-répresseur [Sharma *et al.*, 2000] ou au contraire un co-activateur [Georgiakaki *et al.*, 2006] des récepteurs nucléaires aux hormones.

Pour finir, les HAT(s) MOZ (Monocytic leukaemia zinc-finger protein) et MORF (MOZ-Related Factor) forment des complexes stables avec le suppresseur de tumeur ING5 (Inhibitor of Growth protein 5) et d'autres protéines qui contiennent un bromodomaine et un motif PHD finger (BRPF). Ces complexes présentent une activité acétyltransférase spécifique de l'histone H3 et peuvent fonctionner comme des co-activateurs pour des facteurs de transcription [Doyen *et al.*, 2006].

Comme toutes les modifications post-traductionnelles des histones que nous avons vues à travers cette partie, l'acétylation des histones est un mécanisme réversible et dynamique. Ainsi, nous allons maintenant nous intéresser plus particulièrement aux histones désacétylases (HDAC).

4.2 La désacétylation des histones

Dans les cellules eucaryotes, le mécanisme d'acétylation/désacétylation des histones, mais aussi d'autres protéines, est une des modifications post-traductionnelles les plus abondantes. A l'inverse des HAT(s), les HDAC(s) sont capables d'enlever un groupement acétyle des résidus lysine de leur substrat entraînant un changement dans l'état de condensation de la chromatine. Ainsi, on considère que les HDAC(s) sont des co-répresseurs de la transcription en favorisant un état compacté de la chromatine.

A ce jour, chez l'homme, 18 HDAC(s) ont été identifiées et regroupées en 4 classes en fonction de leur homologie de séquence avec des protéines de la levure (Classe I à IV). Plus généralement, on peut classifier ces enzymes en deux groupes, en fonction de leur mécanisme d'action: les HDAC(s) zinc-dépendantes (Classe I, II et IV) et les Sirtuines qui sont des HDAC(s) qui utilisent comme cofacteur le NAD⁺ (Classe III).

Parmi les HDAC(s) Zn-dépendantes, on retrouve les enzymes de classe I, II et IV qui possèdent toutes un domaine catalytique conservé entre elles, suggérant qu'elles présentent un mécanisme d'action identique. Le domaine catalytique des HDAC(s) Zn-dépendantes est constitué d'une poche tubulaire courbée dans laquelle on retrouve un site de coordination du

Zinc qui participe, dans un système de transfert de charge, à catalyser la réaction de désacétylation des extrémités N-terminales des résidus lysines (Fig 31).

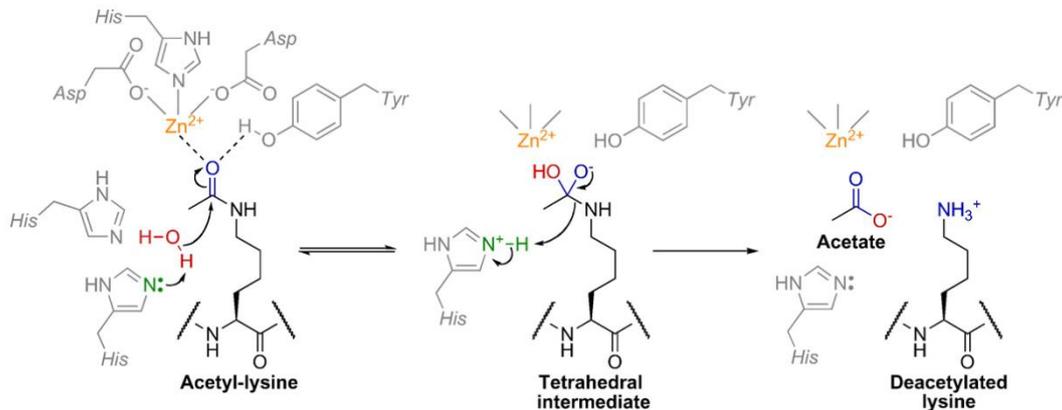


Figure 31: Mécanisme d'action des HDAC(s) Zn-dépendantes [Smith et Denu, 2009]

A. Les HDAC(s) de classe I

Dans la classe I des HDAC(s), on retrouve HDAC 1, 2, 3 et 8 qui sont des homologues de RPD3, un régulateur de la transcription identifié chez la levure [Rundlett *et al.*, 1996]. La structure des enzymes de classe I est caractérisée par la présence d'un domaine catalytique conservé, entouré par de petites extensions amino- et carboxy-terminales (Fig 32). En plus de ce domaine, elles présentent des sites de phosphorylation importants dans la régulation de leur activité catalytique ainsi que des signaux de localisation nucléaire. HDAC1, 2 et 3 peuvent être phosphorylées à leur extrémité C-terminale par la kinase CK2 (Casein Kinase 2) alors que HDAC8 est phosphorylée à son extrémité N-terminale par PKA (Protein Kinase A).



Figure 32: Organisation des différents domaines fonctionnels des HDAC(s) de classe I humaines. [Barneda-Zahonero et Parra, 2012]

Les HDAC(s) de la classe I, comme toutes les HDAC(s) identifiées à ce jour, ne possèdent pas de motif de liaison à l'ADN et leur interaction avec d'autres protéines est nécessaire pour cibler la chromatine. A l'exception d'HDAC8, toutes les HDAC(s) de classe I sont présentes dans des complexes multiprotéiques où elles interagissent avec des facteurs de transcription pour réprimer l'expression de gènes cibles (Fig 33). HDAC1 et HDAC2 sont ainsi retrouvées sous forme d'hétérodimères dans la sous-unité catalytique des complexes Sin3, Mi2/NuRD

et CoREST (Fig 33 A, 33B et 33C) alors que HDAC3 est une sous-unité du complexe N-CoR/SMRT (Fig 33D).

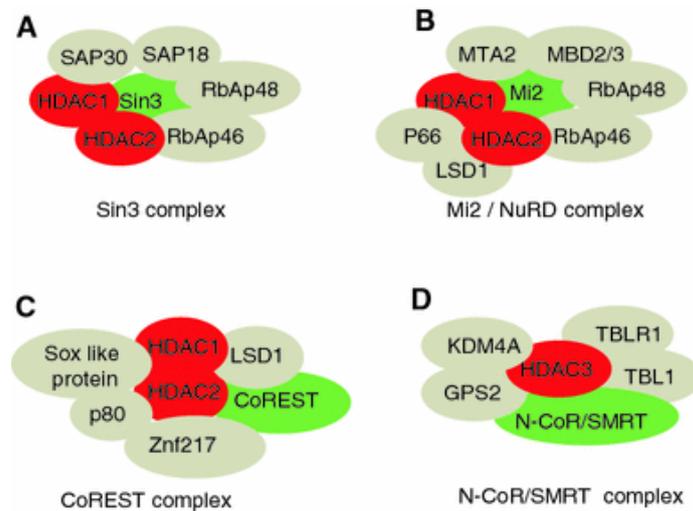


Figure 33: Composition des complexes contenant des HDAC(s) de classe I. (A) Le complexe Sin3 contenant 6 sous-unités dont HDAC1 et HDAC2. (B) Le complexe Mi2/NuRD composé de 8 sous-unités dont HDAC1 et HDAC2. (C) Le complexe CoREST contenant 6 sous-unités dont HDAC1 et HDAC2. (D) Le complexe N-CoR/SMRT composé de 7 sous-unités dont HDAC3 [Reichert *et al.*, 2012].

Chez les mammifères, les HDAC(s) de classe I sont exprimées dans tous les tissus et sont majoritairement localisées dans le noyau des cellules où elles ont une activité catalytique importante sur les résidus lysine des histones. HDAC1 et HDAC2 ont des séquences très similaires et il semble que HDAC2 soit issue d'une duplication de HDAC1 chez les vertébrés. Ces deux enzymes sont impliquées dans de nombreux processus comme la prolifération, le cycle cellulaire et l'apoptose [Segre et Chiocca, 2011]. A l'échelle de l'organisme, ces enzymes sont impliquées dans le développement. HDAC3 joue un rôle important dans le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN [Reichert *et al.*, 2012]. Finalement, HDAC8 est retrouvée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau de la cellule et pourrait avoir un rôle dans la différenciation des muscles lisses [Waltregny *et al.*, 2005]. Elle serait aussi importante dans le maintien de la cohésion du centrosome [Yamauchi *et al.*, 2011]. De plus, il a été mis en évidence, dans le syndrome Cornelia de Lange que HDAC8 régule l'acétylation de SMC3, un composant du complexe cohésine impliqué dans la cohésion des chromatides filles pendant la division cellulaire ainsi que dans la régulation de l'expression des gènes [Deardorff *et al.*, 2012].

B. Les HDAC(s) de classe II

Les HDAC(s) de la classe II sont des homologues de la protéine Hda1 de la levure [Bjerling *et al.*, 2002] et sont divisées en deux sous classes (Classe IIa et IIb).

Dans la classe IIa, on retrouve HDAC4, 5, 7 et 9 qui sont caractérisées par la présence d'un domaine catalytique à leur extrémité C-terminale et un domaine régulateur enrichi en résidus sérine à leur extrémité N-terminale. En plus de ces deux domaines, les HDAC(s) de classe IIa possèdent une séquence d'adressage au noyau ainsi qu'un domaine de fixation au facteur de transcription MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) (Fig 34) [McKinsey *et al.*, 2000].

Les domaines catalytiques des HDAC(s) de classe IIa sont très conservés entre eux et sont relativement proches du domaine catalytique des HDAC(s) de classe I. Néanmoins, il existe d'importantes différences au niveau de la poche catalytique, notamment dans la région d'entrée du substrat et dans l'organisation du système de transfert de charge.



Figure 34: Organisation des différents domaines fonctionnels des HDAC(s) de classe IIa humaines [Barneda-Zahonero et Parra, 2012].

Dans la classe IIb, on regroupe HDAC6 et 10 qui sont caractérisées par un domaine catalytique proche de Hda1 de levure mais qui est dupliqué. Cependant cette duplication est partielle pour HDAC10 car le second domaine n'est pas entier. HDAC6 possède à son extrémité C-terminale un motif zinc finger et HDAC10 un domaine riche en lysine (Fig 35).



Figure 35: Organisation des différents domaines fonctionnels des HDAC(s) de classe IIb humaines [Barneda-Zahonero et Parra, 2012].

A l'inverse des HDAC(s) de classe I qui sont exprimées de façon ubiquitaire dans tous les tissus de l'organisme, les HDAC(s) de classe II sont exprimées dans des tissus spécifiques et sont impliquées dans la différenciation des cellules et dans le développement. Ainsi, elles participent à la répression de l'expression de gènes cibles dans les muscles squelettiques, cardiaques et lisses, dans les os, le cerveau et ont également un rôle dans les cellules du système immunitaire. De par leur extrémité N-terminale enrichie en résidus sérine, les HDAC(s) de classe IIa sont susceptibles à la phosphorylation. Cette modification post-traductionnelle va avoir un rôle critique dans la localisation cytoplasmique ou nucléaire de ces enzymes [Parra *et al.*, 2010]. Même si celles-ci présentent un domaine catalytique conservé, leur spécificité de substrat reste à établir. Cependant, il a été montré que les

HDAC(s) de classe IIa peuvent être associées à d'autres protéines comme des HDAC(s) de classe I dans le complexe répresseur SMRT/N-CoR [Fischle *et al.*, 2002]. HDAC6 est principalement retrouvée dans le cytoplasme où ses cibles principales sont l' α -tubuline et la cortactine [Hubbert *et al.*, 2002]. HDAC10 est à la fois retrouvée dans le cytoplasme et le noyau mais sa spécificité de substrat reste inconnue.

C. Les HDAC(s) de classe IV

A ce jour, le seul membre identifié de la classe IV est HDAC11. Cette enzyme est caractérisée par la présence d'un domaine catalytique qui présente des résidus conservés avec les HDAC(s) de classe I et II et une extrémité N-terminale très courte (Fig 36) [Gao *et al.*, 2002].



Figure 36: Organisation des différents domaines fonctionnels des HDAC(s) de classe IV humaines [Barneda-Zahonero et Parra, 2012].

Cette HDAC est majoritairement exprimée dans les reins, le cerveau, les testicules, le cœur et les muscles squelettiques. Peu d'éléments sont connus concernant son rôle biologique. Cependant, il a été montré que HDAC11 est localisée au niveau du noyau cellulaire [Gao *et al.*, 2002] et qu'elle a un rôle dans la régulation de l'expression de l'interleukine 10 pendant la réponse immunitaire [Wang *et al.*, 2011] et dans le développement des oligodendrocytes [liu *et al.*, 2009]. A l'inverse des HDAC(s) de classe I et II, cette enzyme n'est pas présente dans des complexes multiprotéiques de type Sin3 ou SMRT-NCoR mais il a été montré qu'HDAC11 co-immunoprécipite avec HDAC6 [Gao *et al.*, 2002]. Néanmoins, à ce jour, le rôle biologique de cette interaction est encore inconnu.

Nous allons maintenant nous intéresser plus particulièrement aux HDAC(s) NAD-dépendantes, plus communément appelées les sirtuines.

5. Les HDAC(s) NAD-dépendantes – Les Sirtuines

Les sirtuines sont des HDAC(s) de classe III qui voient leur activité désacétylase dépendante du NAD⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide). En plus de cette activité désacétylase, certaines sirtuines présentent également une activité ADP-ribosyltransférase. Ces enzymes très conservées, retrouvées aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes [Frye, 2000], sont des homologues du répresseur de transcription Sir2 (Silence information regulator 2) identifié chez la levure. Sir2 est impliquée dans la répression de la

Ces différentes analyses phylogénétiques montrent qu'il existe un nombre variable de sirtuines selon les organismes. Ainsi, chez l'archée *S. Solfataricus*, un seul homologue à Sir2p de levure a été identifié alors que chez *S. cerevisiae* et *D. melanogaster*, cinq sirtuines sont présentes. Chez l'homme, et plus généralement chez les mammifères, sept sirtuines (Sirt1 à 7) ont été identifiées [Blander et Guarente, 2004].

5.2 Structure des Sirtuines

Les sirtuines ne présentent pas d'homologie de séquence avec les HDAC(s) de classe I et II précédemment décrites. Un alignement des séquences peptidiques de plusieurs sirtuines appartenant à différentes espèces a permis de montrer qu'elles contiennent un domaine catalytique d'environ 275 acides aminés conservés. De plus, les sirtuines possèdent des extrémités amino- et carboxy-terminales dont les tailles et les séquences sont variables.

A ce jour, plusieurs structures tridimensionnelles des sirtuines de différents organismes ont été déterminées par cristallographie (Fig 38) et ont permis de montrer que le domaine catalytique des sirtuines est composé d'un domaine *Rossmann-fold*, impliqué dans la fixation du NAD⁺ et d'un domaine plus petit, permettant de lier le zinc. Ces deux domaines sont connectés entre eux par plusieurs boucles dont une participe également à la fixation du cofacteur. Le site catalytique est situé à l'interface de ces deux domaines.

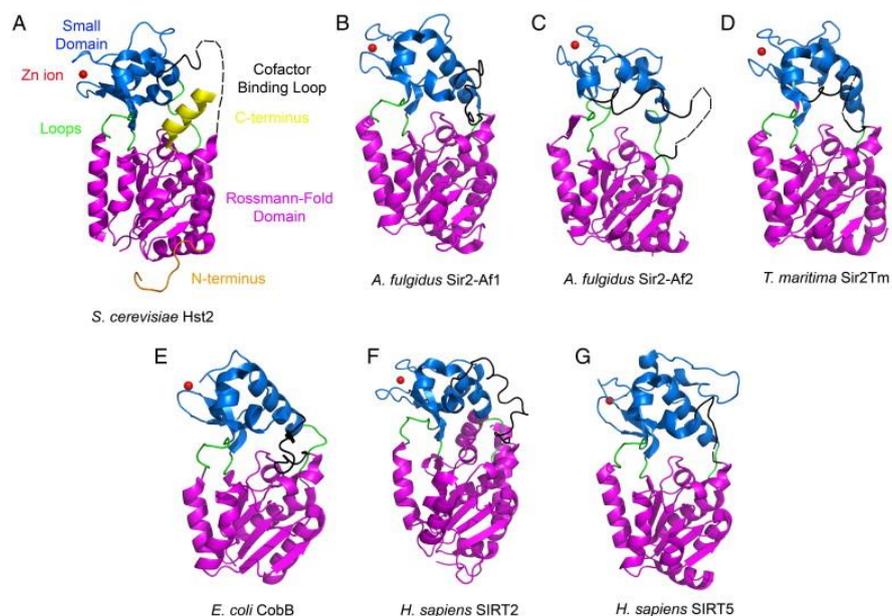


Figure 38: Structure tridimensionnelle des sirtuines de différents organismes. Les enzymes sont représentées sans la fixation d'un ligand. Le domaine *Rossmann fold* est indiqué en magenta, le petit domaine de fixation du Zn, en bleu, les boucles inter-domaines, en vert, la boucle de fixation du cofacteur, en noir, l'ion Zn, en rouge [Sanders *et al.*, 2010].

Le domaine *Rossmann fold* est composé de 6 feuillets β parallèles formant une feuille β centrale entourée par un nombre variable d'hélices α permettant le maintien de la structure. Ce domaine présente des caractéristiques communes avec d'autres protéines capables d'oxyder ou de réduire le NAD^+ ou le NADH [Min *et al.*, 2001]. On retrouve notamment conservé, un motif Gly-X-Gly, important dans la fixation du phosphate, ainsi que des acides aminés chargés qui sont responsables de la fixation du groupement ribose du NAD^+ .

Le domaine de fixation du zinc, moins conservé entre les sirtuines, est divisé en deux modules structuraux résultant de deux insertions dans le domaine *Rossmann fold*. La première insertion est composée de trois hélices α qui forment une poche hydrophobe. Elle pourrait être impliquée dans la spécificité de substrat des sirtuines puisqu'elle n'est présente que dans les sirtuines de classe I. La seconde insertion est composée de feuillets β antiparallèles qui contiennent deux motifs Cys-X-X-Cys séparés par 15 à 20 acides aminés et impliqués dans la fixation du zinc [Finnin *et al.*, 2001, Min *et al.*, 2001]. A l'inverse des HDAC(s) de classe I, II et IV, la localisation de l'ion zinc est trop éloignée du site actif des sirtuines pour participer à leur activité catalytique. Néanmoins, une mutation de ces cystéines en alanines ou l'utilisation d'un chélateur du zinc entraînent une abolition de l'activité enzymatique *in vitro* et *in vivo* des sirtuines [Sherman *et al.*, 1999, Min *et al.*, 2001].

La poche de fixation du NAD^+ est localisée dans le domaine *Rossmann fold*, à l'interface entre ce dernier et le domaine plus petit, impliqué dans la fixation du zinc. Parmi les boucles connectées aux deux domaines, l'une d'entre elles participe également à la fixation du NAD^+ . Le site de fixation du cofacteur peut être divisé en trois régions: le site A où se fixe le groupement adénine ribose du NAD^+ , le site B impliqué dans la fixation du groupement nicotinamide ribose et le site C qui est localisé dans le fond de la poche de fixation. Les sites B et C sont directement impliqués dans la catalyse de la réaction de désacétylation (Fig 39).

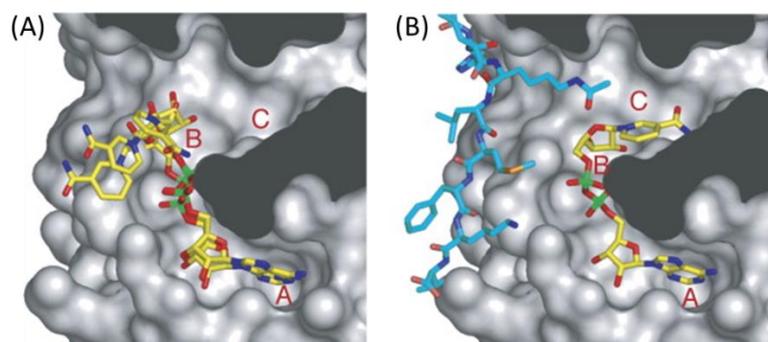


Figure 39: Site catalytique des sirtuines avec la poche de fixation du NAD^+ . La poche de fixation du NAD^+ est divisée en trois sites A, B et C qui sont indiqués en rouge. (A) En absence de substrat, le NAD se fixe aux sites A et B et adopte une conformation non productive. (B) En présence d'un substrat acétylé, le NAD^+ se fixe aux sites A, B et C et adopte une conformation productive. La molécule de NAD^+ est représentée en jaune et le substrat acétylé en bleu [Avalos *et al.*, 2005].

Plusieurs structures de sirtuines ont été déterminées en présence d'un peptide contenant une lysine acétylée comme substrat [Avalos *et al.*, 2002]. Ces études ont permis de montrer que le substrat se fixe à l'intérieur d'une poche hydrophobe, à l'interface du domaine *Rossmann fold* et du petit domaine de fixation du zinc.

5.3 Mécanisme d'action

Les sirtuines catalysent la réaction de désacétylation des lysines en utilisant comme cofacteur le NAD⁺ pour produire du nicotinamide et du 2'-O-acetyl-ADP-ribose (OAADPr). Des études cinétiques ont permis de montrer que cette réaction est séquentielle avec tout d'abord la fixation du substrat puis celle du cofacteur pour former un complexe ternaire.

La première étape consiste au clivage de la liaison nicotinamide-ribose du NAD⁺ et à l'attaque de l'oxygène, du groupement acétyle, pour former un intermédiaire: le α -1'-O-alkylamide et libérer le nicotinamide. Dans la littérature, le mécanisme de formation de cet intermédiaire fait l'objet de débats. Certaines études suggèrent que le clivage de la liaison nicotinamide-ribose et l'attaque de l'oxygène du groupement acétyle se font selon une réaction de type Sn1 (Substitution nucléophile de type 1) en deux étapes distinctes. D'autres équipes proposent que cette réaction soit de type Sn2 (Substitution nucléophile de type 2) et que ces deux réactions aient lieu en une seule étape.

La seconde étape consiste en l'activation du groupement hydroxyle, en position 2 de l'intermédiaire α -1'-O-alkylamide, par une histidine adjacente, permettant une attaque intramoléculaire du carbone de la liaison imine, afin de former un second intermédiaire cyclique. Cet intermédiaire va subir une attaque par une molécule d'eau qui, en présence d'un acide, va générer deux produits finaux: le 2'-O-acetyl-ADP-ribose et la lysine désacétylée (Fig 40).

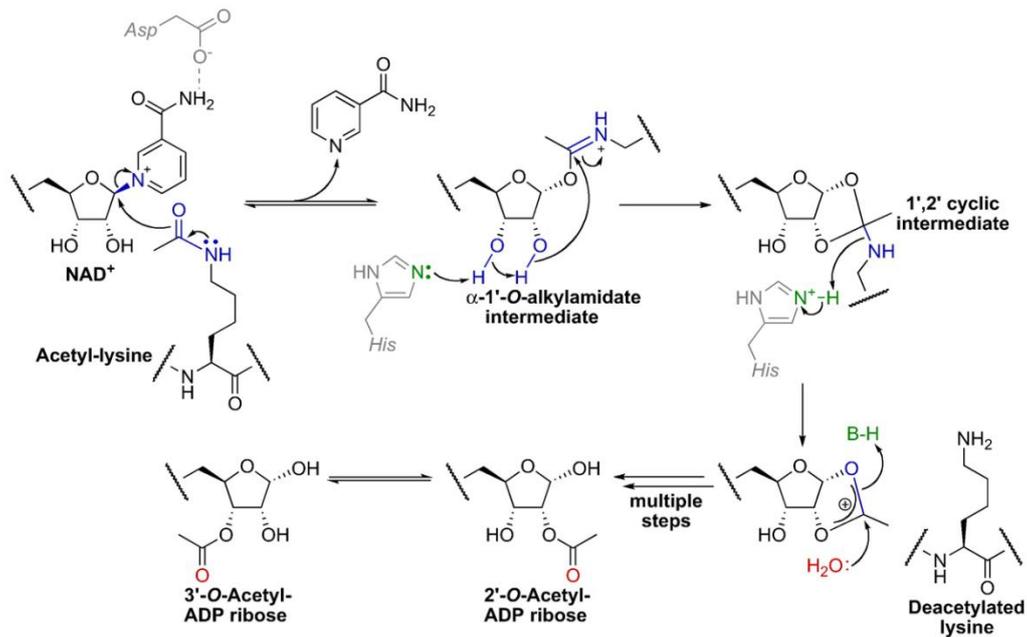


Figure 40: Mécanisme d'action des HDAC(s) de classe III, les sirtuines [Smith et Denu, 2009].

Plusieurs études ont également montré que certaines sirtuines possèdent une activité ADP-ribosyltransférase. Une étude récente a proposé deux mécanismes pour cette réaction. Dans les deux cas, la présence du cofacteur, le NAD^+ , et du substrat, une lysine acétylée est indispensable. Dans le premier mécanisme, la lysine acétylée et le NAD^+ vont réagir dans le site actif de la sirtuine pour former l'intermédiaire α -1'-O-alkylamide. Comme nous l'avons vu précédemment, cet intermédiaire peut réagir avec des groupements alcool suggérant que la chaîne latérale des acides aminés peut être attaquée pour permettre le transfert d'un groupement ADP-ribose sur des protéines cibles [Smith et Denu, 2006]. Dans le second mécanisme, c'est le produit final de la réaction de désacétylation, le 2'-O-acétyl-ADP-ribose, qui pourrait réagir en absence d'activité enzymatique avec d'autres protéines pour permettre leur ADP-ribosylation.

5.4 Localisation cellulaire et fonctions biologiques

Chez l'homme, les sirtuines sont exprimées dans tous les tissus bien qu'un niveau plus élevé d'expression d'ARNm soit détecté dans le cerveau et les testicules pour une majorité d'entre elles. De plus, à l'exception de Sirt2 et Sirt5, l'expression des sirtuines est plus élevée dans le cerveau du fœtus que dans celui de l'adulte, ce qui pourrait indiquer qu'elles jouent un rôle important dans le développement du système neuronal (Fig 41).

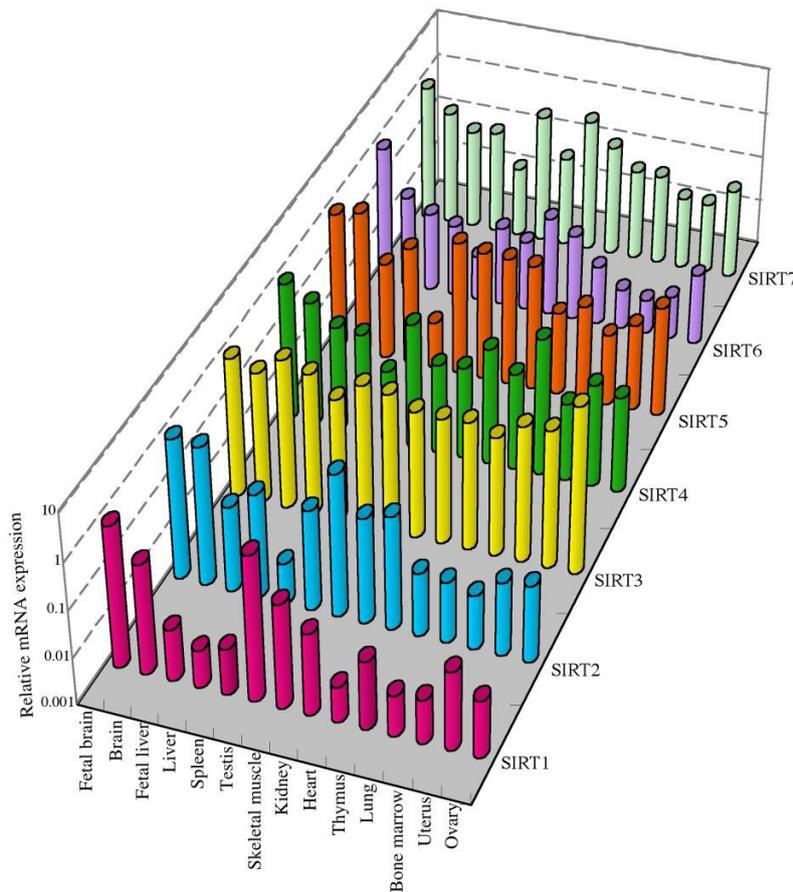


Figure 41: Profil d'expression des sirtuines dans les organes humains. L'expression de chaque gène des sirtuines a été mesurée par RT-PCR quantitative en temps réel dans différents organes. Pour chaque sirtuine, le niveau d'expression dans les différents organes est exprimé par rapport au niveau d'expression dans le cerveau du fœtus [Michishita *et al.*, 2005].

Des expériences de transfection dans des fibroblastes humains, permettant l'expression des sirtuines sous forme de protéines de fusion avec une étiquette GFP, ont permis de montrer que les sirtuines possèdent une localisation sub-cellulaire différente (Fig 42). Ainsi, Sirt1 est détectée majoritairement dans le noyau des cellules mais semble exclue du nucléole et n'est pas enrichie dans les régions qui contiennent l'hétérochromatine. Dans certains contextes, Sirt1 peut également être localisée dans le cytoplasme. La protéine Sirt2 est généralement distribuée dans tout le cytoplasme des cellules mais elle peut également être localisée au niveau du noyau en se fixant à la chromatine pendant la phase G2/M du cycle cellulaire [Vaquero *et al.*, 2006]. Les protéines Sirt3, 4 et 5 ont une localisation mitochondriale, néanmoins une étude a montré que Sirt3 peut être transloquée dans le noyau des cellules dans des conditions de stress cellulaires. Comme Sirt1, les protéines Sirt6 et 7 sont retrouvées essentiellement dans le noyau mais avec des différences de localisation (Fig 42B). En effet, Sirt6 est distribuée à travers tout le noyau et, à l'inverse de Sirt1, cette protéine est retrouvée également localisée dans les régions qui contiennent l'hétérochromatine. Pour finir, Sirt7 est majoritairement concentrée dans le nucléole [Michishita *et al.*, 2005].

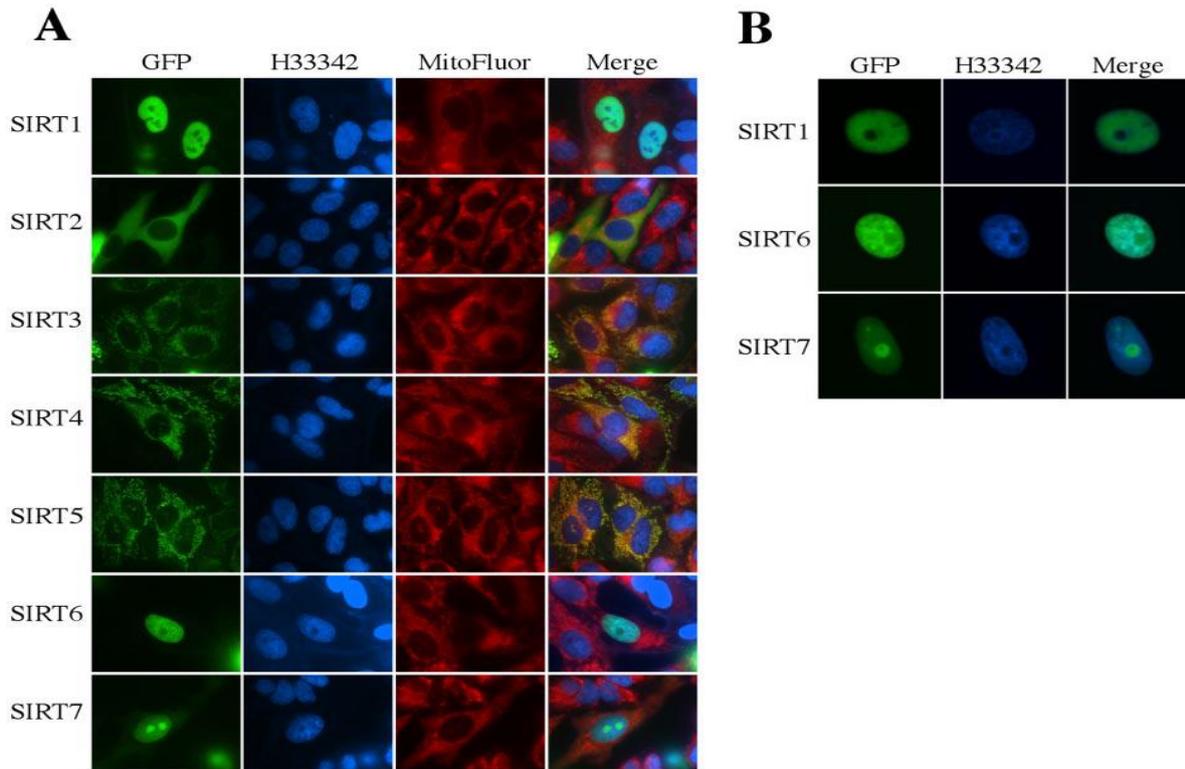


Figure 42: Localisation cellulaire des sirtuines humaines. (A) Chaque sirtuine est exprimée sous forme de protéine de fusion avec une étiquette GFP dans des fibroblastes humains. (B) Localisation sub-nucléaire de Sirt1, 6 et 7 exprimées sous forme de protéines de fusion avec une étiquette GFP dans des fibroblastes humains [Michisita *et al.*, 2005].

De par leurs localisations, leurs activités et leur spécificité de substrat, les sirtuines sont des enzymes impliquées dans de nombreux processus cellulaires, et par conséquent, dans un grand nombre de pathologies (Fig 43). Dans la suite de cette partie, à travers quelques exemples, nous allons aborder les différentes fonctions biologiques des sirtuines chez l'homme.

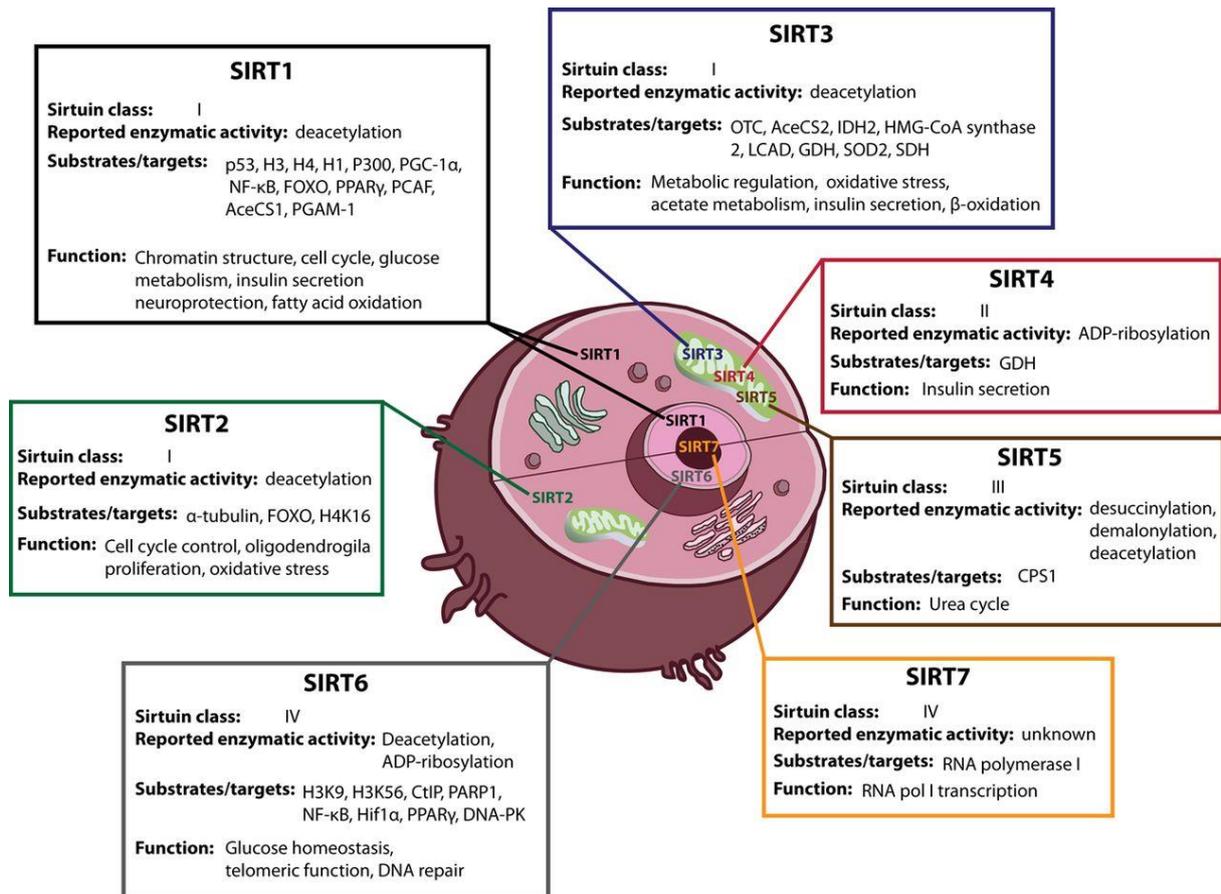


Figure 43: Localisation Subcellulaire des sirtuines chez les mammifères, leurs activités enzymatiques, leurs substrats/cibles ainsi que leurs fonctions cellulaires. PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, PCAF: p300/CPB Associated Factor, OTC: Ornithine Transcarbamylase, LCAD: Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, GDH: Glutamate Dehydrogenase, SDH: Succinate Dehydrogenase, pol: polymérase, CtIP: CTBP-interacting Protein, DNA-PK: DNA-dependent Protein Kinase [Feldman *et al.*, 2012].

Parmi les sirtuines, **Sirt1** est la plus étudiée. Elle possède une activité désacétylase sur les histones mais aussi sur d'autres protéines cellulaires et est impliquée dans différentes fonctions physiologiques, notamment au niveau du foie, des muscles, du pancréas, des testicules, des ovaires et dans le tissu adipeux. Cette enzyme, joue un rôle dans la modification de la structure de la chromatine, le cycle cellulaire, le métabolisme du glucose, la sécrétion d'insuline, la neuroprotection et l'oxydation des acides gras.

Dans les cellules de mammifère, Sirt1 désacétyle l'histone H3 sur ses résidus lysine 9 et 16 ce qui entraîne le recrutement de l'histone H1 et la formation d'hétérochromatine [Vaquero *et al.*, 2004]. Certains facteurs qui contrôlent la prolifération cellulaire et l'apoptose ont été identifiés comme étant des substrats de Sirt1. Parmi ces facteurs, on retrouve le suppresseur de tumeur p53 qui présente plusieurs sites d'acétylation. L'hyperacétylation de p53 va stabiliser et activer ce dernier pour déclencher l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. A l'inverse, la désacétylation par Sirt1 induit sa destruction en faisant intervenir le complexe

MDM2 (Mouse Double Minute 2). De plus, en réponse aux dommages de l'ADN ou dans des conditions de stress cellulaire, il a été montré qu'une surexpression de Sirt1 induit une inhibition de l'activité transcriptionnelle de p53 ainsi qu'une inhibition de l'apoptose. Par opposition, la surexpression d'un dominant négatif de Sirt1 potentialise ces réponses au stress cellulaire. Par exemple, dans des thymocytes de souris KO pour le gène codant Sirt1, il a été montré que l'acétylation de p53 était plus élevée après une exposition à des radiations ionisantes.

Sirt1 affecte également l'activité des facteurs de transcription de la famille FOXO. Dans les cellules de mammifères, les facteurs de croissance induisent l'activation de PI3K ce qui provoque une augmentation de l'activité de la sérine/thréonine kinase AKT et de la protéine kinase B. Ces deux kinases sont capables de phosphoryler et d'inactiver les protéines de la famille FOXO en les séquestrant dans le cytoplasme des cellules. En réponse à un stress oxydatif, Sirt1 désacétyle FOXO3a pour permettre sa translocation au noyau [Brunet *et al.*, 2004]. Dans le noyau, Sirt1 et FOXO3a forment un complexe protéique et induisent l'arrêt du cycle cellulaire dans le but d'augmenter la résistance au stress oxydatif. La formation de ce complexe va également inhiber la capacité de FOXO3a à induire l'apoptose. Dans les hépatocytes, la désacétylation de FOXO1 par Sirt1 va favoriser sa translocation dans le noyau dans le but d'augmenter l'expression de gènes cibles impliqués dans la glycogénèse et le relargage du glucose [Frescas *et al.*, 2005].

Dans les muscles, il a été reporté que Sirt1 joue un rôle important dans la différenciation des myocytes. Le niveau d'expression de Sirt1 et le ratio NAD⁺/NADH diminue au cours de la différenciation des cellules musculaires. Fulco *et al.* ont ainsi démontré qu'une surexpression de Sirt1 retardait la différenciation des muscles *via* la formation d'un complexe protéique entre l'acétyltransférase PCAF et MyoD alors que dans des cellules où l'expression de Sirt1 est diminuée, on note une augmentation de l'activité transcriptionnelle de gènes impliqués dans la différenciation des cellules musculaires [Fulco *et al.*, 2003]. Une autre étude a permis de montrer que Sirt1 est impliquée dans la différenciation des cellules musculaires en désacétylant le facteur de transcription MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) ce qui entraîne son inactivation [Zhao *et al.*, 2005].

Sirt1 est également impliquée dans le contrôle de l'activité métabolique au niveau du pancréas, du foie et dans les tissus adipeux. Dans le pancréas, Sirt1 est retrouvée principalement dans les cellules β des îlots de Langerhans où elle régule positivement la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. L'augmentation de la sécrétion d'insuline est due à une répression d'UCP2 (Uncoupling Protein 2), une protéine qui régule négativement le relargage d'insuline [Bordone *et al.*, 2006]. Dans le foie, Sirt1 induit la glycogénèse et

réprime la glycolyse en désacétylant PGC-1 α (Peroxisome proliferators-activated receptor Gamma Coactivator-1 α), un régulateur clé dans la biogénèse des mitochondries [Rodgers *et al.*, 2005]. Dans les tissus adipeux, Sirt1 empêche le stockage des graisses et augmente la lipolyse en réprimant l'activité de PPAR γ , un régulateur clé de l'adipogénèse qui contrôle l'expression de gènes spécifiques dans les adipocytes [Picard *et al.*, 2004].

Dans le cerveau, au niveau des neurones, la dégénérescence des axones est la caractéristique morphologique majeure qui est observée à la fois dans les neuropathies et les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Charcot. Plusieurs études ont montré que Sirt1 a un rôle protecteur sur les axones dans le système neuronal [Araki *et al.*, 2004] et qu'elle peut atténuer la neurotoxicité des plaques amyloïdes impliquées dans la maladie d'Alzheimer [Chen *et al.*, 2005].

Chez les mammifères, **Sirt2** est majoritairement exprimée dans le cœur, le cerveau, les testicules et les muscles squelettiques où elle présente une activité désacétylase plus particulièrement sur l' α -tubuline et sur l'histone H4. Ainsi, Sirt2 joue un rôle important dans la régulation de la fonction et la stabilité des microtubules ainsi que dans le contrôle du cycle cellulaire [Vaquero *et al.*, 2006].

Des expériences d'immunolocalisation ont permis de mettre en évidence que Sirt2 est co-localisée avec les microtubules [North *et al.*, 2003]. Les microtubules sont formés par la polymérisation d'hétérodimères d' α et de β -tubuline et sont impliqués dans la régulation de la morphologie et de la mobilité des cellules, le transport intracellulaire et la division cellulaire. *In vitro* et *in vivo*, il a été montré que Sirt2 désacétyle l' α -tubuline sur son résidu lysine 40 et qu'une interférence du gène codant Sirt2 entraîne une hyperacétylation de la tubuline. Cependant, à ce jour, le rôle biologique de la désacétylation de la tubuline par Sirt2 n'est pas encore connu.

Concernant la régulation du cycle cellulaire, il a été démontré que le niveau global d'acétylation de l'histone H4 sur son résidu lysine 16 diminue avant l'entrée en mitose des cellules. Cette diminution coïncide avec une augmentation de l'expression de Sirt2, sa translocation dans le noyau et son association avec la chromatine [Vaquero *et al.*, 2006]. De plus, il a été montré qu'une surexpression de Sirt2 entraîne une augmentation de la durée de la phase M [Dryden *et al.*, 2003]. L'ensemble de ces constatations met en évidence un rôle de Sirt2 dans le contrôle du cycle cellulaire.

Sirt3 est majoritairement exprimée dans le cerveau, le cœur, le foie, les reins, les testicules et les muscles. Les premières études concernant la localisation sub-cellulaire de Sirt3 suggère que cette enzyme réside dans les mitochondries et qu'elle présente une

activité désacétylase sur de nombreuses protéines mitochondriales [Schwer *et al.*, 2002 ; Onyango *et al.*, 2002]. Cependant, des études plus récentes ont démontré que Sirt3 est présente dans le noyau des cellules et qu'elle exerce une activité désacétylase sur les histones [Scher *et al.*, 2007 ; Nakamura *et al.*, 2008]. Sirt3 est impliquée chez les mammifères dans la régulation du métabolisme et dans celle des fonctions des mitochondries en augmentant la respiration cellulaire et en diminuant la production d'espèces réactives de l'oxygène [Shi *et al.*, 2005].

Par exemple, il a été mis en évidence que Sirt3 active l'AceCS (Acetyl-CoA Synthetase) et que son activation entraîne la formation d'acetyl-CoA qui est un intermédiaire dans le cycle de Krebs et qui est aussi nécessaire à la synthèse du cholestérol et des acides gras [Hallows *et al.*, 2006]. Plus récemment, il a été montré que dans des conditions de restriction calorique, Sirt3 désacétyle et active l'acetyl-CoA déshydrogénase pour augmenter la β -oxydation des acides gras [Hirschev *et al.*, 2010].

Sirt4 est une autre protéine mitochondriale qui régule l'utilisation de l'énergie dans les cellules. Contrairement aux autres sirtuines, Sirt4 ne semble pas posséder d'activité désacétylase mais présente uniquement une activité ADP-ribosyltransférase. Cette enzyme joue un rôle important dans la régulation de la sécrétion de l'insuline en inhibant l'activité de la GDH (Glutamate Dehydrogenase) dans les cellules β du pancréas [Haigis *et al.*, 2006].

Sirt5 est la dernière des sirtuines à avoir été caractérisée chez l'homme et est décrite comme étant une protéine mitochondriale [Michisita *et al.*, 2005]. *In vitro*, cette enzyme présente une faible activité désacétylase et aucune activité ADP-ribosyltransférase n'a été détectée. Cependant, des études récentes ont montré que Sirt5 possède une activité désuccinylase et démalonylase spécifique des résidus lysine. A ce jour, seules quelques protéines cibles de Sirt5 ont été identifiées. Néanmoins, il a été montré *in vivo* chez des souris KO pour le gène codant Sirt5 que les cellules du foie sont enrichies en protéines succinylées et malonylées [Du *et al.*, 2011]. En 2009, il a été montré que Sirt5 désacétyle et active la CPS-1 (Carbamoyl Phosphate Synthetase 1), une enzyme clé dans le cycle de l'urée et impliquée dans la détoxification des cellules en transformant l'ammonium en urée [Nakagawa *et al.*, 2009].

Sirt6 est une protéine nucléaire qui présente une faible activité désacétylase mais qui est dotée d'une activité ADP-ribosyltransférase robuste. De plus, Sirt6 présente *in vitro*, une activité désacétylase sur les histones, uniquement lorsque celles-ci sont assemblées sous forme d'octamère au sein d'un nucléosome [Gil *et al.*, 2013]. Plus récemment, il a été montré que Sirt6 est capable de catalyser la réaction de suppression de groupements caractéristiques des longues chaînes d'acide gras comme le myristoyle. Ainsi, Sirt6 favorise

la sécrétion de TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) en supprimant les acides gras présents sur ces résidus K19 et K20 [Jiang *et al.*, 2013]. De plus, Sirt6 est impliquée dans le maintien de l'intégrité du génome. En effet, il a été mis en évidence dans des fibroblastes d'embryons de souris Sirt6^{-/-} une augmentation des fréquences d'apparitions d'aberrations chromosomiques variées [Mostoslavsky *et al.*, 2006]. Dans ces mêmes cellules, il a été montré que la délétion de Sirt6 entraîne une diminution de leur prolifération et qu'elle augmente leur sensibilité vis-à-vis d'agents génotoxiques. La régulation de la stabilité génomique par Sirt6 est reliée à sa fonction dans la réparation par excision de bases de l'ADN simple brin. Dans une autre étude, les auteurs ont montré que des souris KO pour le gène Sirt6 meurent prématurément à la suite de plusieurs processus dégénératifs incluant la perte de graisse sous-cutanée, la diminution de la densité osseuse, l'apparition de colite et d'une lymphopénie [Mostoslavsky *et al.*, 2006]. Sirt6 est impliquée également dans la régulation du métabolisme du glucose puisque des souris Sirt6^{-/-} succombent à une hypoglycémie. Dans un article récent, Zhong *et al.* ont démontré que Sirt6 désacétyle l'histone H3K9 pour contrôler l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'homéostasie du glucose [Zhong *et al.*, 2010]. Par ailleurs, il a été démontré que Sirt6 est capable d'interagir avec l'HAT GCN5 afin d'augmenter son activité catalytique dans le but de diminuer la production de glucose hépatique [Dominy *et al.*, 2012].

Sirt7 est à ce jour, la sirtuine la moins étudiée. L'expression de Sirt7 est enrichie dans les tissus qui présentent un potentiel élevé de prolifération comme ceux du foie, de la rate et des testicules. A l'inverse, elle est moins exprimée dans les cellules du cœur, du cerveau et dans les muscles squelettiques. C'est une enzyme que l'on retrouve également localisée dans le noyau des cellules où elle est associée à l'activation des gènes codant l'ARN ribosomal (ARNr) via son interaction avec ARN polymérase I [Ford *et al.*, 2006]. Ainsi, une surexpression de Sirt7 augmente la transcription d'ARNr alors qu'un effet inverse est observé lorsque l'on diminue son expression. De plus, certains auteurs suggèrent que Sirt7 est impliquée dans la biogénèse des ribosomes et la synthèse des protéines [Tsai *et al.*, 2013].

5.5 Régulation de l'activité des sirtuines

A. Les activateurs de sirtuines

Depuis 1935, il est établi qu'une restriction calorique permet d'améliorer la santé et prolonge la durée de vie des mammifères [McCay *et al.*, 1935]. Les sirtuines et plus particulièrement Sirt1 semblent jouer un rôle important dans ce processus [Bordone et Guarente, 2005] puisqu'une délétion de ces enzymes dans différents organismes abolis

l'augmentation de leur durée de vie induite par la restriction calorique [Boily *et al.*, 2008]. Les souris *Sirt1*^{-/-} soumises à un régime hypocalorique présentent une activité métabolique intense. Il a également été montré que ces souris possèdent une activité mitochondriale altérée dans le foie et qu'elles utilisent de façon inefficace les calories qu'elles ingèrent. Plus récemment il a été démontré que le rôle de *Sirt1* dans la régulation de la durée de vie de certains organismes est lié au nicotinamide (NAM), le produit de la réaction de désacétylation des sirtuines issu du clivage de leur co-substrat, le NAD⁺. En effet, chez le nématode *C. elegans*, le NAM et son métabolite, le 1-méthylnicotinamide (MNA) augmente sa durée de vie, même en absence de *Sirt1* [Schmeisser *et al.*, 2013]. Ces différents constats suggèrent qu'une augmentation de l'activité de *Sirt1* pourrait être bénéfique pour l'organisme et ont permis la découverte et le développement de nouvelles molécules capables d'activer les sirtuines.

Des composés naturels, comme le resvératrol [Howitz *et al.*, 2003] ou synthétiques sont capables d'activer *Sirt1 in vitro* en réduisant l'affinité de l'enzyme vis-à-vis d'un substrat peptidique. Ces composés sont appelés des STAC(s) (Sirtuin Activating Compounds). Le premier STAC à avoir été identifié comme capable de mimer la restriction calorique en activant les sirtuines est le resvératrol. Cette molécule, présente dans le raisin et certains de ses dérivés comme le vin rouge, contient deux cycles phénols séparés par un pont méthylène (Fig 44A). Le resvératrol augmente l'activité de *Sirt1* jusqu'à 8 fois [Howitz *et al.*, 2003] et celle de processus cellulaires *Sirt1*-dépendants comme la mobilisation des graisses et l'inhibition de la transcription NF- κ B dépendante. Ces processus sont identiques à ceux induits par une restriction calorique. Ainsi, le Resvératrol permet de mimer les effets de la restriction calorique chez la levure, *C. elegans* et *D. melanogaster*, sans affecter l'expression des gènes codant les sirtuines [Howitz *et al.*, 2003 ; Wood *et al.*, 2004]. Des études *in vivo*, ont montré que le resvératrol permet d'améliorer la santé générale de souris soumises à une forte restriction calorique. Les souris traitées présentent une réduction significative des signes de vieillissement comme une diminution de l'albuminurie, de la formation de la cataracte, une diminution de l'inflammation et de l'apoptose des cellules de l'endothélium vasculaire. En plus de ces effets, on note chez ces souris, une augmentation de l'élasticité de l'aorte, une meilleure coordination des membres et un maintien de la densité minérale des os [Pearson *et al.*, 2008]. Toutefois, le rôle des STAC(s) comme activateurs directs de *Sirt1* est controversé. En effet, il a été suggéré que ces activateurs se liaient aux substrats fluorophores utilisés dans le dosage de l'activité enzymatique de *Sirt1* et qu'ils permettaient d'augmenter ainsi l'affinité de l'enzyme pour le substrat. De plus, l'activation de *Sirt1* par les STAC(s) n'aurait pas lieu *in vivo* [Borra *et al.*, 2005]. Néanmoins, cette objection a été levée

récemment et il a été montré que les STAC(s) sont des activateurs directs de Sirt1 [Hubbard *et al.*, 2013]

A la suite de ces différentes études, plusieurs équipes ont cherché à identifier de nouveaux activateurs de sirtuines, plus efficaces que le resvératrol. Parmi ces nouveaux STAC(s) identifiées, SRT1720 est une petite molécule activatrice de Sirt1 qui présente une structure très différente du resvératrol (Fig 44B) et qui est 100 fois plus active que ce dernier. Cette molécule permet d'augmenter de 750% l'activité de Sirt1 à 10 μ M. Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que cet activateur augmente la désacétylation de plusieurs substrats de Sirt1 comme p53, PGC-1 α ou encore FoxO1a [Smith *et al.*, 2009]. Comme le resvératrol, *in vivo*, chez des souris soumises à une forte restriction calorique, le SRT1720 permet d'augmenter leur durée de vie et a des effets bénéfiques sur leur santé générale. Cette molécule permet chez ces souris traitées de réduire les stéatoses du foie, d'augmenter leur sensibilité à l'insuline, de favoriser leurs activités motrices et de normaliser les profils d'expression de gènes marqueurs de l'inflammation et de l'apoptose. De plus, dans des études précliniques pour le traitement du cancer, il a été montré que ce composé induit *in vitro* l'apoptose de nombreuses cellules dans le myélome et diminue significativement la croissance de xénogreffes chez la souris [Chauhan *et al.*, 2011].

Plus récemment, de nouvelles molécules activatrices de Sirt1, sans relation structurale avec le resvératrol, ont été identifiées. Le composé le plus efficace est un dérivé de l'imidazo[1,2-b]thiazole qui présente une bonne biodisponibilité orale chez la souris comparativement à celle du resvératrol. Cet activateur a montré une activité anti-diabétique dans trois modèles murins utilisés dans l'étude du diabète de type 2. Une autre molécule, appelée SRT2104 (Fig 44C) a montré *in vitro* des propriétés anti-inflammatoires intéressantes. Utilisée dans des essais cliniques de phase IIa chez des patients atteints de maladies métaboliques, inflammatoires et cardiovasculaires, cette molécule s'avère non toxique et très bien tolérée. Dans une étude en double aveugle, SRT2104 a montré une atténuation significative de la production d'IL-6 et d'IL-8 induite par le LPS couplée à une activation de la coagulation [Villalba *et al.*, 2012]. Pour finir, l'équipe du Professeur Mai a synthétisé de nouveaux dérivés de la 1-4 dihydropyridine (Fig 44D) qui ont montré une activité activatrice *in vitro* de Sirt1, Sirt2 et Sirt3. Cette activation permet d'augmenter la densité mitochondriale et réduit la sénescence dans des cellules de myoblastes de souris [Mai *et al.*, 2009].

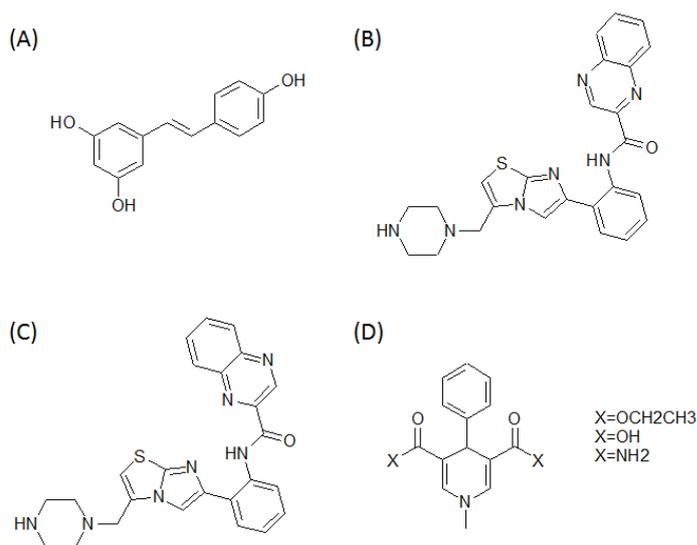


Figure 44: Exemples d'activateurs de sirtuines. (A) Resvératrol, (B) SRT1720, (C) SRT2104 et (D) dérivés de la 1-4-dihydropyridine.

B. Les inhibiteurs de sirtuines

Comme nous venons de le voir, les activateurs de sirtuines ont un impact bénéfique en augmentant l'activité de Sirt1 dans différents modèles animaux. Les inhibiteurs de sirtuines sont également activement étudiés pour le traitement de diverses pathologies. Dans le cas des cancers, Sirt1, 2, 3, 6 et 7 jouent un rôle important dans le développement des tumeurs [Bruzzone *et al.*, 2013]. Ainsi, il a été montré que Sirt1, 2 et 3 agissent comme des suppresseurs de tumeurs dans des modèles génétiques murins. De plus, la surexpression de Sirt6 dans des lignées cellulaires cancéreuses induit l'apoptose [Van Meter *et al.*, 2011]. Le rôle de cette enzyme comme suppresseur de tumeur a été confirmé en montrant que l'inactivation du gène codant Sirt6 dans des fibroblastes embryonnaires de souris suffisait au développement de tumeur. Par ailleurs, l'inactivation conditionnelle de ce gène dans un modèle de souris présentant une tumeur colorectale entraîne une augmentation significative de la taille de la tumeur [Sebastian *et al.*, 2012]. Toutefois, les sirtuines peuvent également favoriser la croissance tumorale et, dans ce contexte, il semble que leur inhibition soit préférable à leur activation. Le rôle de Sirt1 dans la désacétylation et l'inactivation du suppresseur de tumeurs p53 et des facteurs pro-apoptotiques FoxO a stimulé la recherche d'inhibiteurs de cette enzyme pour le traitement de certains cancers. Il en est de même pour Sirt2 pour laquelle il a été montré que l'inhibition ou la régulation négative de son expression induit des effets anti-leucémiques. Cependant, il est difficile de prévoir si la modulation de l'activité des sirtuines permettra d'obtenir un effet bénéfique sur la croissance tumorale sans observer d'effets secondaires. A ce jour, aucun inhibiteur de sirtuines n'est en phase d'essais clinique pour le traitement du cancer.

En plus de leur rôle en tant qu'agent anticancéreux, les inhibiteurs de sirtuines ont été proposés dans le traitement de la maladie de Parkinson [Outeiro *et al.*, 2007], la

leishmaniose [Vergnes *et al.*, 2005] et dans le traitement du VIH [Pagans *et al.*, 2005]. A l'inverse des activateurs de sirtuines qui ont été développés uniquement contre Sirt1, les inhibiteurs de sirtuines, qui ont été identifiés par criblage à haut débit ou par criblage *in silico*, ciblent essentiellement Sirt1, Sirt2, Sirt3 et Sirt5. La plupart des inhibiteurs qui ont été caractérisés à ce jour, ciblent préférentiellement Sirt1 et Sirt2 mais certains d'entre eux présentent également une activité inhibitrice sur Sirt3 et Sirt5 avec une plus faible affinité.

Toutes les sirtuines utilisent le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) comme cofacteur. La réaction de désacétylation d'un substrat entraîne la libération de nicotinamide à partir du NAD⁺ alors que l'ADP ribose va se fixer au peptide acétylé pour former un intermédiaire O-alkylamide. Le nicotinamide (Fig 45A) s'avère être un inhibiteur physiologique non compétitif des sirtuines en se fixant à nouveau sur l'intermédiaire O-Alkylamide de l'enzyme pour entraîner une diminution de son activité catalytique [Sauve et Schramm, 2003]. Le nicotinamide inhibe Sirt1 avec une IC₅₀ égale à 50 µM et Sirt2 avec une IC₅₀ deux fois plus élevée [Tervo *et al.*, 2004]. En 2009, il a été rapporté que le nicotinamide augmente la maturation et la ploïdie des mégacaryocytes sans altérer leur structure. De plus, il a été montré que le nicotinamide est responsable de l'inhibition de Sirt1 et permet d'augmenter l'affinité du facteur de transcription p53 pour des gènes cibles [Giammona *et al.*, 2009].

Dans le but de fournir un nouvel outil pour mieux comprendre la fonction de Sir2 *in vivo* chez la levure, l'équipe de Bedalov a identifié un nouveau composé, la splitomycine (Fig 45B). Cette molécule permet de créer un phénotype identique à celui retrouvé lors d'une délétion du gène de Sir2 de *S. cerevisiae* [Bedalov *et al.*, 2001]. La splitomycine inhibe Sir2 avec une IC₅₀ égale à 60 µM mais son activité inhibitrice est faible sur son homologue humain Sirt1. Néanmoins, il a été montré que l'inhibition de Sirt1 par un dérivé de la splitomycine a un effet antiprolifératif dans des cellules cancéreuses du sein [Neugebauer *et al.*, 2008]. Un autre dérivé, le HR73 (Fig 45C) inhibe *in vitro* Sirt1 humaine avec une IC₅₀ inférieure à 5 µM. Ce composé a été utilisé pour étudier le rôle de l'inhibition de Sirt1 dans la régulation de la transcription du VIH [Pagans *et al.*, 2005].

Découvert en 2001 par Grozinger, le sirtinol (Fig 45D) est un inhibiteur de l'activité *in vitro* de Sir2 de levure et de Sirt2 humaine [Grozinger *et al.*, 2001]. Deux analogues, le m- et le p-sirtinol, sont respectivement de 2 à 10 fois plus efficaces que le sirtinol sur hSirt1 et hSirt2. Le sirtinol a été étudié dans le cadre du traitement du cancer et il a été montré que dans des cellules cancéreuses du sein et du poumon son utilisation permet *in vivo* de stopper la croissance cellulaire. Dans d'autres types de cellules, le sirtinol permet d'induire une augmentation de leur sensibilité à un traitement chimiothérapeutique tel que la camptothécine ou le cisplatine. Le traitement au sirtinol permet également de réduire

l'inflammation dans des cellules endothéliales microvascularisées de la peau en modulant l'expression de molécules d'adhésion et en favorisant l'adhésion des monocytes [Orecchia *et al.*, 2011]. Pour finir, il a été montré que ce composé induit l'apoptose chez *Leishmania infantum* en inhibant significativement *in vitro* la prolifération des amastigotes [Vergnes *et al.*, 2005].

La salermide (Fig 45E) présente un groupement amide inversé et une structure semblable à celle du sirtinol. Cette molécule est très active *in vitro* sur hSirt1 et hSirt2. Très bien tolérée chez la souris, elle induit l'apoptose indépendamment de p53 dans des cellules cancéreuses mais pas dans des cellules normales [Lara *et al.*, 2009]. Cependant, lors d'une autre étude réalisée sur des cellules de carcinome du sein et sur des fibroblastes de souris déficientes en p53, il a été montré que ce facteur de transcription était indispensable à l'induction de l'apoptose par la salermide [Peck *et al.*, 2010].

Un screening à haut débit de plus de 280 000 composés a été réalisé sur Sirt1 et a permis de mettre en évidence de potentiels inhibiteurs sélectifs. Les composés les plus actifs présentent la particularité de posséder un motif indole. Ces composés inhibent spécifiquement Sirt1 avec une IC₅₀ proche de 80 nM alors qu'elle est de 19.6 µM pour Sirt2 et de 47 µM pour Sirt3. De plus, aucune activité inhibitrice n'a été observée sur les HDAC(s) de classe I et II [Napper *et al.*, 2005].

De nombreuses autres molécules ont été identifiées comme des inhibiteurs potentiels de sirtuines. Parmi eux, le MS3 (Fig 45F), un thiobarbiturate présente une forte affinité pour les sirtuines mais avec une faible sélectivité entre Sirt1 et Sirt2 [Uciechowska *et al.*, 2008].

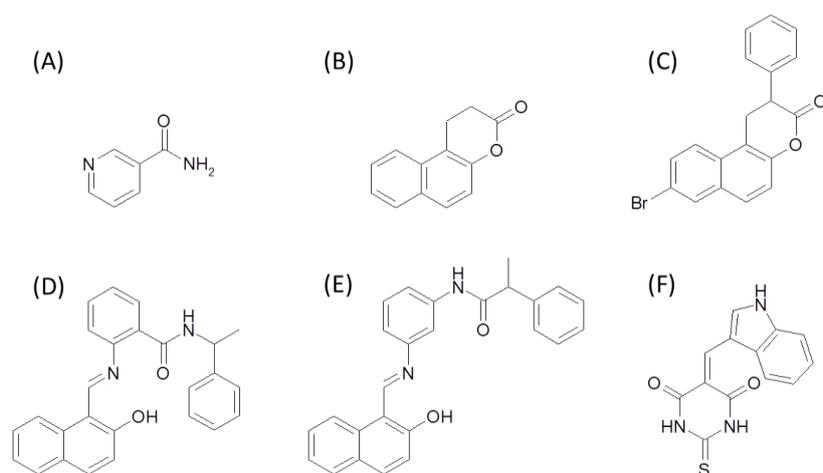


Figure 45:

Exemples d'inhibiteurs de sirtuines. (A) Nicotinamide, (B) Splitomycine, (C) HR73, dérivé de la splitomycine (D) Sirtinol, (E) Salermide et (F) MS3, dérivé thiobarbiturate.

III Epigénétique et Schistosome

La publication des génomes de *S. mansoni* [Berriman *et al.*, 2009], de *S. haematobium* [Young *et al.*, 2012] et de *S. japonicum* [The *Schistosoma japonicum* Genome Sequencing and Functional Analysis Consortium, 2009] a permis une accélération importante des recherches dans le domaine de la génétique chez le schistosome. La recherche de marqueurs épigénétiques dans le génome du parasite, ainsi que la caractérisation des enzymes responsables de ces modifications épigénétiques, revêt actuellement un intérêt important pour plusieurs équipes de recherches.

Les premières études sur la modification de la structure de la chromatine chez *S. mansoni* ont été initiées pour déterminer le rôle de l'épigénétique dans la différenciation mâle-femelle du parasite et, plus particulièrement, sur le rôle de l'hétérochromatine dans la détermination du sexe du schistosome [Grossman *et al.*, 1981]. Depuis, il a été démontré que la structure de la chromatine de *S. mansoni* était similaire à celle de nombreux autres métazoaires. En effet, l'analyse du génome de *S. mansoni* a permis d'identifier des gènes codant pour les histones H2A, H2B, H3, et H4 mais aussi un gène pour l'histone de liaison H1 [Anderson *et al.*, 2012]. Cependant, seule l'histone H4 a été expérimentalement confirmée comme étant une composante de la chromatine [Souza *et al.*, 2002]. L'histone H3 peut être détectée chez le schistosome à l'aide d'anticorps spécifiques [Cosseau *et al.*, 2009]. Plusieurs isoformes de l'histone H3 ont été identifiées, dont deux sont des orthologues des variant d'histones H3.2, H3.3. De plus, l'analyse des séquences protéiques des histones H2A, H2B et, dans une moindre mesure, de l'histone H1, a permis de montrer qu'elles étaient conservées entre les espèces [Anderson *et al.*, 2012].

Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suivies d'analyses par Western Blot ont permis de montrer que tous les sites de phosphorylation, d'acétylation et de méthylation des histones H2A, H2B et H3 étaient présents chez *S. mansoni*. Ainsi, il a été démontré que certaines des modifications des histones, associées à la formation de l'euchromatine, telles que la méthylation de H3K4, l'acétylation de H3K9 ainsi que l'acétylation de l'extrémité N-terminale de l'histone H4 sont également présentes chez le schistosome. Il en est de même pour la triméthylation de H3K9 et de H3K27, qui sont des marqueurs de l'hétérochromatine [Cosseau *et al.*, 2009 ; Caby et Pierce, 2009].

Parmi les mécanismes épigénétiques connus chez l'homme, la méthylation de l'ADN chez le schistosome est actuellement celle qui fait le plus débat. En effet, chez la plupart des eucaryotes, les cytosines constitutives de l'ADN peuvent être méthylées en position 5' de leur cycle pyrimidine (5mC). Cette modification covalente et réversible de l'ADN joue un rôle

dans la régulation de la structure de la chromatine et, par conséquent, dans la modulation de l'expression des gènes. Des études initiales menées par Fantappie et son équipe ont démontré que la méthylation de l'ADN était un mécanisme épigénétique absent chez *S. mansoni* [Fantappie *et al.*, 2001]. Néanmoins, plus tard, l'identification d'un gène codant pour une méthyltransférase spécifique de l'ADN chez *S. mansoni* (SmDnmt2) a relancé les recherches dans ce domaine. Récemment, il a été montré qu'il existait un faible taux de cytosines méthylées (5mC) chez *S. mansoni* et qu'une extinction du gène codant SmDnmt2 par ARN interférence entraînait une diminution de la méthylation de l'ADN chez le ver adulte. Les auteurs suggèrent également que la méthylation de l'ADN aurait un rôle fonctionnel dans le développement et la ponte des vers adultes de schistosomes [Geyer *et al.*, 2011]. De plus, il a été constaté que *S. mansoni* présentait une protéine (Smp-138180) capable de se fixer aux 5mC via son domaine MBD (Methyl Binding Domain) et qu'elle pouvait interagir avec d'autres protéines spécifiques de la chromatine [Hendrich et Bird, 1998]. Cependant, en 2013, l'équipe de Raddatz a réalisé le séquençage complet au bisulfite du génome de *S. mansoni* et aucune cytosine méthylée dans l'ADN n'a été détectées [Raddatz *et al.*, 2013]. Ces travaux récents démontrent formellement que la méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique absent chez le schistosome.

Depuis plusieurs années, au laboratoire, notre équipe s'intéresse aux enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles des histones et plus particulièrement aux HDAC(s). En effet, l'émergence d'un rôle potentiel de ces enzymes en tant que cibles thérapeutiques dans le traitement des cancers [Bolden *et al.*, 2006] et dans un certain nombre de parasitoses [Ouaissi et Ouaissi, 2006] a motivé nos recherches pour mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques chez *S. mansoni* en se focalisant sur les enzymes impliquées dans les modifications des histones [Pierce *et al.*, 2011, Annexe 1]. Ainsi, les premiers travaux ont permis de mettre en évidence chez *S. mansoni*, 3 orthologues d'HDAC(s) de classe I de mammifères: SmHDAC1, 3 et 8 [Oger *et al.*, 2008]. De plus, le traitement de parasites en culture avec des inhibiteurs d'HDAC(s) de classe I humaines tels que la trichostatine A (TSA), l'acide valproïque (VPA) ou l'acide hydroxamique subérylanilide (SAHA) a permis de montrer que ces enzymes étaient impliquées dans la survie parasitaire. En effet, le traitement de schistosomules *in vitro* par ces inhibiteurs induit la mort des parasites de manière dose-dépendante. Par ailleurs, la mise en place d'expériences de TUNEL a permis de montrer que l'utilisation de la TSA permettait d'induire l'apoptose des cellules du parasite. D'un point de vue moléculaire, notre équipe a montré que la TSA et la VPA provoquent chez le parasite une hyperacétylation de l'histone H4 corrélée à une augmentation de l'expression de certains gènes cibles des HDAC(s) comme *Caspase 3* et *Caspase 7* qui sont impliqués dans la mise en place de l'apoptose [Dubois *et*

al., 2009]. Ces résultats préliminaires, qui concernent les HDAC(s) de classe I, nous ont encouragés à étendre notre étude et à caractériser un grand nombre d'enzymes responsables de la modification des histones chez *S. mansoni*.

Ainsi, dans le cadre d'un projet financé par la Commission Européenne (Projet SEtTReND: Schistosome Epigenetics: Targets, Regulation, New Drugs), l'analyse *in silico* du génome de *S. mansoni* a permis de mettre en évidence tous les gènes du schistosome codant pour des enzymes modifiant les histones et plus particulièrement ceux codant pour des histones méthyltransférase, déméthylase, acétyltransférase et déacétylase [Pierce *et al.*, 2012, Annexe 2]. Ainsi, cette analyse a permis de montrer que l'on retrouve chez le schistosome pas moins de 9 HAT(s) dont 2 sont des représentants de la famille CBP/p300, 4 de la famille MYST, 2 de la famille GNAT et 1 de la famille TAFII 250. Concernant les enzymes qui présentent une activité déacétylase, cette analyse a montré que 3 HDAC(s) de classe I, 3 HDAC(s) de classe II ainsi que 5 HDAC(s) de classe III (Sirtuines) sont présentes chez *S. mansoni*. Parmi les HMT(s) identifiées chez *S. mansoni*, 18 appartiennent à la famille des protéines qui présentent un domaine SET, 5 sont de la famille PRMT et une seule enzyme appartient à la famille DOT1/DOT1L. Pour finir, cette analyse *in silico* a permis d'identifier 11 histones déméthylases dont 3 sont similaires à l'enzyme LSD1 et 8 sont des protéines qui contiennent un « jumonji C-domain » (JmjC) caractéristique de certaines histones déméthylases.

Au cours du projet SEtTReND, nous avons également déterminé la structure cristallographique de SmHDAC8. De plus, la comparaison du domaine catalytique de SmHDAC8 avec celui de l'enzyme HDAC8 humaine, nous a permis de mettre en évidence des différences structurales au niveau du site catalytique des deux enzymes qui ont été exploitées afin d'identifier des inhibiteurs sélectifs de SmHDAC8 [Marek *et al.*, 2013, Annexe 3].

OBJECTIF DE L'ETUDE

La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques et le développement de nouveaux médicaments pour traiter la schistosomiase sont devenus indispensables à long terme pour pallier les différents inconvénients liés à l'utilisation du PZQ. Ainsi, dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer de nouveaux précurseurs de médicaments, notre équipe, ainsi que 9 partenaires en Europe et au Brésil, ont proposé d'étudier les enzymes modifiant les histones comme cibles thérapeutiques potentielles. L'objectif de ce projet a été dans un premier temps de caractériser plus particulièrement les enzymes impliquées dans l'acétylation/désacétylation et la méthylation/déméthylation des histones chez *S. mansoni*. Par la suite, certaines de ces cibles ont été exprimées sous forme de protéines recombinantes pour déterminer la structure de leur domaine catalytique dans le but de concevoir des inhibiteurs spécifiques de ces enzymes. Chez le parasite, la mise en place d'expériences d'ARN interférence ainsi que l'utilisation d'inhibiteurs génériques de ces enzymes sur des parasites en culture nous a permis de valider ces cibles potentielles et de générer des profils d'expression des gènes spécifiques de ces enzymes. Pour finir, des études *in silico* et *in vitro* ont permis d'identifier de nouveaux inhibiteurs qui ont été optimisés chimiquement dans le but d'augmenter leur affinité vis-à-vis des enzymes du parasite.

Le projet de recherche mené au cours de ma thèse est étroitement lié au projet SEtTReND. En effet, dans un premier temps, le premier objectif de cette étude a été de caractériser l'ensemble des sirtuines (HDAC(s) de classe III) présentes chez *S. mansoni*. Par la suite, le traitement de parasites *in vitro* ainsi que la mise en place d'expériences d'ARN interférence ont eu pour but de valider une ou plusieurs sirtuines comme cibles thérapeutiques potentielles. En parallèle, nous avons eu pour objectif d'exprimer ces cibles candidates sous forme de protéines recombinantes dans des systèmes hétérologues afin de déterminer leur structure cristallographique. Dans un second temps, nous avons cherché à identifier de nouveaux précurseurs de médicaments spécifiques des enzymes du parasite. Pour ce faire, deux stratégies ont été mises en place. D'une part, à partir des protéines recombinantes purifiées et enzymatiquement actives, nous avons pour objectif d'identifier par un screening à haut débit de nouvelles molécules inhibitrices des sirtuines de *S. mansoni*. La seconde stratégie mise en place a été d'identifier virtuellement par criblage *in silico*, à partir de la modélisation du site catalytique, des inhibiteurs qui présentent une affinité significative pour les sirtuines du parasite. Les inhibiteurs identifiés comme candidats potentiels ont ensuite été testés *in vitro* chez le parasite afin de déterminer leur toxicité. La mise en place de dosages enzymatiques des sirtuines nous a également permis de déterminer les IC₅₀ de ces inhibiteurs sur les enzymes recombinantes. L'ensemble de ces

analyses nous a permis de sélectionner des composés qui seront ensuite optimisés chimiquement afin d'augmenter leurs affinités vis-à-vis des sirtuines de *S. mansoni*.

L'ensemble des résultats qui a été obtenus au cours de cette étude nous a permis d'identifier et de valider une ou plusieurs sirtuines comme cibles thérapeutiques potentielles. De plus, l'identification et la bio-optimisation de composés inhibiteurs de ces enzymes ont pour objectif d'obtenir de nouveaux candidats précurseurs de médicaments. Pour finir, cette étude a également eu pour objectif de mieux comprendre la fonction biologique des sirtuines dans la survie et la reproduction du parasite.

RESULTATS

Partie 1: Caractérisation des sirtuines de *Schistosoma mansoni*: Cibles thérapeutiques potentielles.

Comme nous venons de le voir au cours de cette introduction, le développement de nouvelles drogues pour traiter la schistosomiase est devenu nécessaire afin de pallier les inconvénients liés à l'utilisation massive du PZQ. Dans le but d'identifier de nouveaux médicaments, la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques s'avère indispensable. Dans la littérature, plusieurs études ont démontré que les HDAC(s) sont des cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement des cancers [Bolden *et al.*, 2006] mais également dans celui de certaines parasitoses [Ouaissi et Ouaissi, 2006]. Ainsi, dans le cadre du projet SEtTReND, notre équipe s'est focalisée sur les enzymes impliquées dans la modification de la structure de la chromatine et plus précisément sur celles qui jouent un rôle dans le mécanisme d'acétylation et de désacétylation des histones chez le schistosome.

Dans le but d'étendre notre étude à d'autres classes d'enzymes impliquées dans la modification des histones chez *S. mansoni*, je me suis intéressé plus particulièrement au cours de ma thèse aux HDAC(s) de classe III: les sirtuines. Les premiers résultats obtenus au cours de mon projet de recherche concernent la caractérisation moléculaire de ces enzymes ainsi que l'étude de leur rôle potentiel en tant que cible thérapeutique.

Une analyse *in silico* du génome de *S. mansoni* a permis de mettre en évidence 5 orthologues potentiels des sirtuines présentes chez les mammifères: Sirt1 (Smp_138640), Sirt2 (Smp_084140), Sirt5 (Smp_055090), Sirt6 (Smp_134630) et Sirt7 (Smp_024670) [Communication personnelle de Laila Nahum]. Dans un premier temps, la mise en place d'expériences de RACE PCR nous a permis de vérifier les séquences prédites et de détecter d'éventuelles isoformes dues à un mécanisme d'épissage alternatif. Les résultats obtenus nous ont permis de confirmer l'existence de chaque gène prédit et de corriger un certain nombre d'erreurs d'assemblage présentes dans la banque de donnée génomique du schistosome. Dans un second temps, nous avons réalisé une analyse phylogénétique des séquences protéiques correspondantes aux 5 séquences codantes des sirtuines que nous avons identifiées. L'alignement des domaines catalytiques de ces enzymes avec des homologues présents dans d'autres espèces nous a permis de montrer que les résidus essentiels à la fixation du cofacteur, le NAD⁺, ainsi que ceux impliqués dans la fixation du substrat et du zinc sont globalement conservés chez le parasite, ce qui laisse supposer que ces enzymes présentent des fonctions conservées chez *S. mansoni*. A partir de cet alignement, l'élaboration d'un phylogramme montre que toutes les sirtuines identifiées chez

S. mansoni se retrouvent, avec leurs orthologues présents dans d'autres espèces, regroupées dans 4 classes (I à IV). Ces différentes classes ont été définies dans une étude phylogénétique des sirtuines chez les eucaryotes [Frye, 2000]. Par la suite, des expériences de PCR quantitative en temps réel ont montré que des transcrits de tous les gènes des sirtuines de *S. mansoni* étaient présents à tous les stades de développement du parasite mais avec des profils d'expressions différents.

Afin d'étudier le rôle potentiel des sirtuines en tant que cibles thérapeutiques dans le traitement de la schistosomiase, des parasites maintenus en culture au laboratoire ont été traités avec des inhibiteurs génériques des sirtuines humaines. Notre étude s'est portée sur les deux stades parasitaires que l'on retrouve présents chez l'homme, le schistosomule et le ver adulte. Ainsi, nous avons pu montrer que le traitement de schistosomules *in vitro* par des inhibiteurs de sirtuines tels que la salermide, le sirtinol, le MS3, le MS13, le HR103 ainsi que le CS13 permettait d'induire la mort des parasites en fonction de la durée du traitement mais aussi avec des efficacités limitées pour certains. Par ailleurs, la mise en place de la technique de TUNEL, après traitement des schistosomules, nous a permis d'étudier la capacité des inhibiteurs de sirtuines à induire l'apoptose. Les résultats obtenus montrent que la salermide, le sirtinol et le MS3 induisent, après 48H de traitement, la fragmentation de l'ADN dans les cellules du parasite, suggérant l'induction de l'apoptose. Dans le but de déterminer l'effet des inhibiteurs génériques de sirtuines humaines sur les vers adultes maintenus en culture, nous avons décidé d'étudier la stabilité de l'accouplement des vers ainsi que le nombre d'œufs produits au cours du traitement. Ainsi, nous avons pu montrer que tous les inhibiteurs génériques de sirtuines humaines testés, affectent la stabilité de l'accouplement des vers adultes de manière dose-dépendante et permettent de diminuer la production des œufs par la femelle schistosome après 6 jours de traitement. Pour compléter ces résultats, nous avons analysé par microscopie confocale à balayage laser, l'effet de la salermide à 10 et 20 μ M sur la morphologie de l'ovaire et des testicules de vers adultes traités pendant 6 jours. Ces observations, ont permis de montrer que la salermide à 10 μ M induit une diminution drastique du nombre de cellules germinales dans les testicules du ver adulte. Chez la femelle, nous avons observé une désorganisation de l'ovaire avec une augmentation significative du nombre d'ovocytes matures comparativement au témoin non traité. Chez le mâle comme chez la femelle, ces effets sont amplifiés lorsque les vers adultes sont traités avec une concentration plus importante en salermide.

Pour finir, nous avons pu montrer par des expériences d'ARN interférence qu'une extinction du gène codant pour la protéine Sirt1 permettait chez la femelle d'observer un phénotype au niveau de l'ovaire. De plus, celui-ci est identique à celui obtenu après le traitement des vers

par la salermide. Néanmoins, l'interférence de ce gène chez le mâle ne présente aucun effet significatif sur la morphologie des testicules.

Dans cet article, intitulé **Schistosoma mansoni Sirtuins: Characterization and Potential as Chemotherapeutic Targets**, nous avons caractérisé l'ensemble des sirtuines de *S. mansoni* et étudié leurs rôles en tant que cibles thérapeutiques. L'ensemble des résultats obtenus suggère que les sirtuines de *S. mansoni* sont des cibles thérapeutiques potentielles pour le développement de nouvelles drogues anti-schistosome.

L'ensemble des expériences a été réalisé au laboratoire avec l'aide des équipes du Pr Manfred Jung et du Dr Franz Bracher qui ont fourni les composés CS13, MS3, MS13 et HR103 utilisés au cours de cette étude.

Partie 2: Etude du rôle potentiel de SmSirt2 comme cible thérapeutique dans le traitement de la schistosomiase et développement d'inhibiteurs

I Introduction

Dans cette seconde partie, nous allons, dans un premier temps, nous intéresser aux résultats non publiés concernant l'étude du rôle potentiel de SmSirt2 comme cible thérapeutique anti-schistosome, puis dans un second temps nous focaliser sur les résultats relatifs au développement d'inhibiteurs de cette enzyme. Chez les mammifères, Sirt2 est une enzyme désacétylase NAD⁺ dépendante de la famille des HDAC(s) de classe III. Elle est majoritairement localisée au niveau du cytoplasme des cellules où elle désacétyle, par exemple, l' α -tubuline [North *et al.*, 2003]. Cependant, il a été montré que Sirt2 peut également se retrouver dans le noyau des cellules où elle est impliquée dans la désacétylation des histones [Vaquero *et al.*, 2006]. Plusieurs études ont montré que Sirt2 est impliquée dans de nombreux processus cellulaires.

Sirt2 joue un rôle essentiel dans le fonctionnement du cerveau. En effet, il a été montré qu'elle est essentielle à la myélinisation de par son action sur la protéine Par-3 [Beirowski *et al.*, 2011]. De plus, dans des modèles cellulaires et animaux de la maladie de Parkinson, Sirt2 est impliquée dans la dégénérescence des neurones [Outeiro *et al.*, 2007].

Elle est également impliquée dans le mécanisme d'inflammation en désacétylant la sous-unité p65 du régulateur de transcription NF- κ B. En effet, dans des fibroblastes de souris Sirt2^{-/-}, l'hyperacétylation de p65 s'accompagne d'une augmentation de l'expression des gènes NF- κ B dépendants, induite par le TNF [Rothgiesser *et al.*, 2010]. Le récepteur RIP-1 (Receptor- Interacting Protein 1) est un autre substrat de Sirt2. Ce dernier est également impliqué dans les voies de signalisations de l'inflammation et sa désacétylation stabilise le complexe RIP-1-RIP-3 pour induire la mort cellulaire [Narayan *et al.*, 2012].

Très récemment, le rôle de Sirt2 a également été étudié dans l'infection bactérienne à *Listeria monocytogenes*. Les auteurs rapportent que, durant l'infection, les bactéries induisent la translocation de Sirt2 vers le noyau des cellules où elle désacétyle l'histone H3K9 afin de réprimer l'expression de gènes de leur hôte. L'induction de cette modification épigénétique est due au facteur de virulence InlB, une protéine présente à la surface de la bactérie qui est nécessaire à son entrée dans les cellules de l'hôte. Une délétion de Sirt2,

dans des souris Sirt2^{-/-} ou l'invalidation de l'expression de Sirt2 dans des cellules par l'ARNi, induit une réduction significative de l'infection par *Listeria monocytogenes* [Eskandarian *et al.*, 2013].

Lors de notre étude, nous avons étudié le rôle potentiel de SmSirt2 comme cible thérapeutique dans le traitement de la schistosomiase. De plus, nous avons identifié des inhibiteurs sélectifs de cette enzyme qui pourront être optimisés pour devenir des précurseurs de médicaments. Pour ce faire, deux stratégies ont été mises en place. La première repose sur une analyse *in silico* à partir de la modélisation de la structure de SmSirt2. Cette stratégie nous a permis de générer des modèles d'interaction entre l'enzyme et des inhibiteurs de sirtuines humaines déjà identifiés. L'analyse de ces modèles a permis de mettre en évidence des différences structurales au niveau du site catalytique de SmSirt2, par rapport à l'enzyme humaine, suggérant qu'il serait possible de concevoir des inhibiteurs sélectifs de l'enzyme du parasite. La deuxième stratégie consiste à mettre en place un criblage à haut débit dans lequel plus de 80 000 composés ont été testés sur l'enzyme recombinante afin d'établir des courbes dose-réponse au moyen d'un dosage fluorimétrique. Cette stratégie nous a permis de sélectionner des séries de composés de natures chimiques différentes qui pourront être optimisés dans le but d'augmenter leur affinité pour l'enzyme du parasite. Afin d'évaluer la toxicité des composés les plus prometteurs, nous avons étudié leurs effets *in vitro* sur des parasites maintenus en culture. Ainsi, nous avons étudié l'effet de ces inhibiteurs sur la viabilité des schistosomules ainsi que sur la stabilité de l'accouplement des vers adultes et la production des œufs au cours du traitement. Pour finir, nous avons envisagé d'invalider l'expression du gène codant pour SmSirt2 par la mise en place d'expériences d'ARNi afin de confirmer le rôle potentiel de SmSirt2 comme cible thérapeutique.

Au cours de ce travail, de nombreuses collaborations ont été mises en place. Au laboratoire, nous avons réalisé l'étude de la toxicité des inhibiteurs de SmSirt2 sur des schistosomules et des vers adultes en culture. Nous avons également mis en place les expériences d'ARNi du transcrit codant SmSirt2 et effectué, à partir de la protéine recombinante, l'immunisation de souris afin d'obtenir des anticorps dirigés contre SmSirt2. Dans le cadre de deux stages réalisés dans les équipes du Dr Christophe Romier et du Pr Manfred Jung, j'ai participé à l'optimisation de l'expression de la protéine SmSirt2 recombinante et étudié son activité enzymatique afin d'établir des courbes d'inhibition dose-réponse de différents inhibiteurs de sirtuine humaines. Pour finir, la modélisation de la structure de SmSirt2 a été réalisée par le Dr Wolfgang Sippl et le criblage à haut débit a été effectué par le Dr Johan Schultz.

II Matériels et Méthodes

Clonage, expression et purification de SmSirt2 recombinante

La séquence complète de *SmSirt2* a été amplifiée par PCR en utilisant les oligonucléotides SmSirt2FLF/SmSirt2FLR (Tableau 1). Le produit de PCR a été cloné entre les sites NdeI et BamHI d'un vecteur pnEA-tH qui code pour une étiquette poly-histidines en position N-terminale suivie d'un site de clivage par la thrombine. La version tronquée de SmSirt2 (SmSirt2N1C1: acides aminés 21 à 322) a été amplifiée en utilisant les amorces SmSirt2N1F/SmSirt2C1R et insérée de la même manière que la version entière dans un vecteur pnEA-tH.

L'expression des protéines recombinantes a été effectuée dans des bactéries *E. coli* BL21(DE3) contenant le vecteur pRARE dans du milieu LB (Luria Broth). L'expression de la protéine est induite à 25°C en ajoutant une concentration finale de 0.5 mM d'Isopropyl-1-Thio-β-D-Galactopyranoside (IPTG, Euromedex) et en présence de 100 μM de ZnCl₂. Puis, les bactéries sont centrifugées et reprises dans un tampon de lyse (400 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8) pour être fragmentées par sonication. Le lysat est ensuite clarifié par centrifugation (17000 rpm, JA-25.50 Beckman) pendant 1 heure puis déposé sur une colonne d'affinité contenant une résine de Nickel (Clontech) pré-équilibrée avec le tampon de lyse. La protéine recombinante SmSirt2, qui présente une étiquette poly-histidines, est éluée de la résine par un traitement à la thrombine avant d'être déposée sur une colonne de filtration sur gel HiLoad 16/60 Superdex 200 (Amersham Bioscience) préalablement équilibrée avec un tampon contenant 400 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8 et 2 mM DTT. Pour finir, la protéine recombinante est concentrée à l'aide d'un filtre moléculaire (Amicon Ultra centrifugal filter units, Millipore) pour obtenir une concentration finale de 2 mg/mL.

Production d'anticorps et détection de SmSirt2 par Western Blot

Un anticorps polyclonal dirigé contre SmSirt2 a été obtenu par injection sous-cutanée d'une émulsion contenant 50 μg de SmSirt2 et un volume équivalent d'adjuvant d'Alun (Al(OH)₃) dans 5 souris BALB/c. 21 jours et 35 jours après la première injection, on réalise une nouvelle injection avec la même émulsion. 45 jours post-injection, les souris sont sacrifiées et le sérum est collecté. Les extraits totaux des protéines des différents stades de développement de *S. mansoni* ont été obtenus après broyage des parasites dans un tampon de lyse (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, Triton X100 1%). La

concentration des protéines a ensuite été déterminée en utilisant le kit Pierce[®] BCA Protein Assay selon les instructions du fabricant. Pour chaque stade, 50 µg de protéines totales ont été analysées par Western Blot en utilisant des anticorps anti-SmSirt2 (dilution 1:1000) et un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de souris couplé à la peroxydase (dilution 1:50000). Le sérum pré-immun (dilution au 1:1000) a été utilisé comme contrôle négatif.

Dosage de l'activité enzymatique de SmSirt2 et détermination de l'IC₅₀ d'inhibiteurs génériques de sirtuines humaines

La mesure de l'activité enzymatique de SmSirt2 est réalisée au moyen d'un dosage fluorimétrique en plaque 96 puits [Heltweg *et al.*, 2003]. Ce dosage utilise un substrat non-peptidique, le Z-MAL ((S)-[5-Acetylamino-1-(4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-ylcarbamoyl)-pentyl]-carbamic acid benzyl ester) (Fig 1). L'enzyme et le substrat sont dilués dans un tampon nécessaire à l'activité enzymatique (25 mM Tris-HCl pH 8, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl₂). Une solution de NAD⁺ est préparée à une concentration de 3,98 mg/mL. Brièvement, 5 µl d'une solution de Z-MAL à 12.6 mM sont mélangés avec 1, 5, 10 et 20 µl d'enzyme SmSirt2 et 5 µl de solution de NAD⁺. Le volume est ajusté à 60 µl dans tous les puits et la plaque est incubée à 37°C pendant 4 heures. Pour finir, la réaction est stoppée en ajoutant 60 µl d'une solution composée de 10 µl de Trypsine (6 mg/mL), 4 µl de nicotinamide (120 mM) et 46 µl de tampon trypsine dans chaque puits. La mesure de la fluorescence est réalisée avec un lecteur de plaque BMG Polastar qui utilise une longueur d'onde d'excitation de 390 nm et une longueur d'onde d'émission égale à 460 nm.

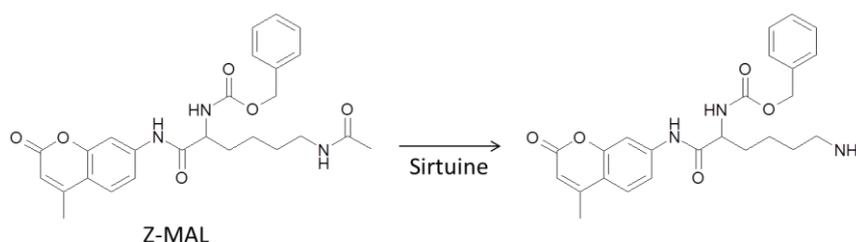


Figure 1: Désacétylation du substrat non peptidique, Z-MAL, par SmSirt2 dans le dosage fluorimétrique [d'après Heltweg *et al.*, 2003]

Pour la détermination des IC₅₀ des inhibiteurs de sirtuines génériques, les composés sont repris dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde) pour obtenir une solution stock à 10mM. Les solutions d'inhibiteurs sont ensuite diluées successivement pour obtenir 8 solutions filles. Les concentrations finales en inhibiteur utilisées dans le dosage varient de 1 nM à 500 µM. Le dosage est réalisé en incubant 5 µl de substrat (12.6 mM) avec 14 µl d'enzyme (1.9 mg/mL),

5 μL de NAD^+ (3,98 mg/mL), 1 μL d'inhibiteur et 35 μL de tampon. La plaque est incubée à 37°C pendant 4 heures et la réaction est arrêtée comme décrit précédemment.

Criblage à haut débit sur SmSirt2 recombinante

Le criblage à haut débit a été réalisé sur l'enzyme recombinante SmSirt2 et plus de 80 000 composés appartenant à la société Kancera AB ont été testés. La mesure de l'activité enzymatique est basée sur le même dosage fluorimétrique décrit précédemment. Cependant, les conditions du dosage et les quantités de réactifs utilisées ont été optimisées afin de minimiser les volumes de substrat et d'enzyme. Le dosage est réalisé dans des plaques 384 puits et les volumes de réactifs sont distribués par un robot EDC Biosystems acoustic dispenser, ATS-100AV. Ce dosage utilise un substrat non peptidique, le Z-MAL ((S)-[5-Acetylamino-1-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-ylcarbamoyle)-pentyl]-carbamic acid benzyl ester). Un tampon nécessaire à l'activité enzymatique (25 mM Tris-HCl pH 8, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 0,5 mM DTT, 0,017% Triton X-100) est utilisé pour diluer l'enzyme, le substrat ainsi qu'une solution de NAD^+ à 6 mM, préparée extemporanément. Dans un premier temps, tous les composés ont été testés à 10 μM afin de sélectionner uniquement ceux qui présentent une activité inhibitrice sur SmSirt2. Dans chaque puits, 20 nL de composés (10 μM final) sont incubés pendant 30 minutes avec 5 μL d'enzyme (0,005 mg/mL finale) à température ambiante. Ensuite, 5 μL d'une solution contenant le substrat Z-MAL (50 μM finale) et le cofacteur, le NAD^+ (500 μM finale) sont ajoutés pour démarrer la réaction. La plaque est incubée 1 heure à 37°C et la réaction est arrêtée par l'ajout de 10 μL d'une solution (50 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl) contenant du Nicotinamide (8 mM finale) et de la trypsine (1 mg/mL finale). Enfin, la plaque est incubée pendant 30 minutes à 37°C avant de mesurer la fluorescence à l'aide d'un lecteur Envision (PerkinElmer) à une longueur d'onde d'excitation de 380 nm et une longueur d'onde d'émission égale à 485 nm.

A la suite de ce criblage préliminaire, les composés présentant une activité inhibitrice sur SmSirt2 ont été sélectionnés afin de déterminer leur IC_{50} à l'aide de courbes dose-réponse. Les solutions stocks des différents composés (10 mM) ont été diluées successivement à l'aide d'un robot JANUS Liquid Handling Workstation afin d'obtenir 11 solutions filles dont les concentrations varient de 1 nM à 100 μM . Dans chaque puits, 0,1 μL de composés sont incubés pendant 30 minutes avec 5 μL d'enzyme (0,005 mg/mL finale) à température ambiante. Ensuite, le dosage est effectué comme décrit précédemment.

Etude de la cytotoxicité des inhibiteurs de SmSirt2 sur des lignées cellulaires humaines

A la suite de ce criblage, la toxicité des composés les plus prometteurs a été étudiée sur des lignées cellulaires cancéreuses du foie HepG2, des os U-2 OS, du pancréas PACA2, du cerveau SK-N.BE/ SK-N.AS ainsi que sur une lignée normale de fibroblastes à l'aide du kit CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega) selon les recommandations du fournisseur. La mesure de la toxicité des composés sur les différentes lignées cellulaires est effectuée au moyen d'une méthode fluorimétrique afin d'estimer le nombre de cellules viables présentes dans des plaques multi-puits. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un indicateur coloré, la rézasurine, afin de mesurer l'activité métabolique des cellules. Ainsi, les cellules vivantes ont la capacité de métaboliser la rézasurine en rézorufine, un composé hautement fluorescent (Fig 2). A l'inverse, les cellules mortes ne présentent pas d'activité métabolique capable de réduire la rézasurine pour générer un signal fluorescent. Pour ce faire, 25 µL d'une suspension cellulaire sont mis en contact dans des plaques 384 puits avec des inhibiteurs de SmSirt2 à 20 µM pendant 48 heures à 37°C. Ensuite, 5 µL de rézasurine sont ajoutés dans chaque puits et la plaque est incubée à 37°C pendant 2 à 4 heures. Pour finir, la fluorescence est mesurée à l'aide d'un lecteur Envision (PerkinElmer) à une longueur d'onde d'excitation de 560 nm et une longueur d'onde d'émission égale à 590 nm.

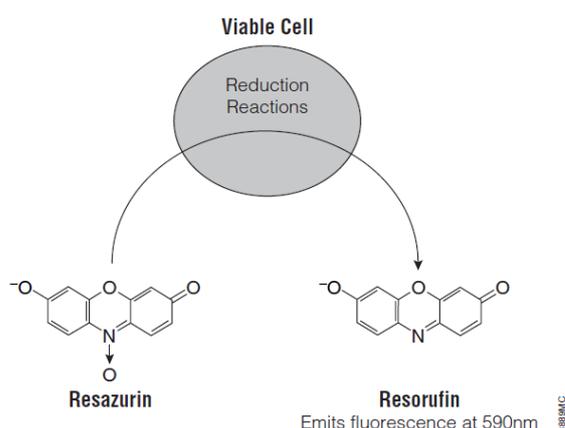


Figure 2: Réduction de la Résazurine en Résorufine par l'activité métabolique des cellules viables.

Matériels biologiques

Une souche Portoricaine de *S. mansoni* est maintenue au laboratoire en utilisant comme hôte intermédiaire des mollusques *Biomphalaria glabrata* et comme hôte définitif des hamsters dorés *Mesocricetus auratus*. Les vers adultes sont obtenus par perfusion portale

des hamsters 6 semaines après l'infestation [Smithers et Terry, 1965]. Les œufs sont obtenus à partir des foies de hamsters infectés et sont placés sous une source lumineuse pour provoquer leur éclosion afin d'obtenir des miracidiums. Les miracidiums sont maintenus en culture pendant 48 heures dans une solution de CBSS (Chernin's Balanced Salt Solution) supplémentée avec une concentration en glucose et en tréhalose de 1mg/mL afin d'effectuer leur transformation *in vitro* en sporocystes primaires [Yoshino et Laurens, 1995]. Les cercaires sont libérées des mollusques infectés et sédimentées dans la glace comme décrit précédemment [Bertin *et al.*, 2006]. Les schistosomules sont obtenus *in vitro* par transformation mécanique [Ramalho-Pinto *et al.*, 1974].

Toxicité des inhibiteurs de SmSirt2 sur des schistosomules et des vers adultes de *S. mansoni* maintenus en culture

L'effet des inhibiteurs de SmSirt2 sur la viabilité des schistosomules de *S. mansoni* a été étudié selon le protocole précédemment décrit [Dubois *et al.*, 2009]. Brièvement, 2000 schistosomules sont incubés à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂ pendant 5 jours dans 2 mL de milieu M199 complet (10% SVF, 10 mM Hepes pH 7.4, 60 µg/mL rifampicine, 15 µg gentamycine et 50U pénicilline/streptomycine) avec des concentrations différentes d'inhibiteurs (10 et 20 µM) dissous dans du DMSO. Le milieu est changé quotidiennement et la mortalité des parasites est estimée sous microscope chaque jour en tenant compte de 3 critères: l'absence de mobilité, l'apparition de dommages au niveau du tégument ainsi que l'apparence granuleuse des parasites. Un minimum de 300 larves est observé pour chacune des conditions et le ratio du nombre de larves mortes sur le nombre de larves totales est calculé. Les expériences sont réalisées en duplicat pour chaque condition à partir de 3 réplicats biologiques indépendants.

Pour mesurer l'effet des inhibiteurs de SmSirt2 sur la stabilité de l'accouplement de vers adultes maintenus en culture, les parasites obtenus après perfusion des hamsters infectés, sont lavés dans du milieu M199. 10 couples sont incubés dans 2 mL de milieu M199 complet pendant 6 jours à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂. [Vanderstraete *et al.*, 2013, Annexe 4]. Deux concentrations d'inhibiteur (10 et 20 µM) sont testées. Le nombre de vers appariés est déterminé tous les jours par microscopie. Dans chaque puits, le milieu contenant les œufs est quotidiennement centrifugé et le nombre total d'œufs pondus au cours du traitement est déterminé par observation sous microscopie. Les expériences sont réalisées en duplicat pour chaque condition à partir de 3 réplicats biologiques indépendants.

ARN interférence

Un fragment d'environ 600 paires de bases de la séquence codante de *SmSirt2* a été amplifié par PCR en utilisant les amorces SmSirt2RNAiF/SmSirt2RNAiR (Tableau 1). Le produit de PCR a ensuite été ré-amplifié avec les amorces SmSirt2RNAiT7F/SmSirt2RNAiR et SmSirt2RNAiF/SmSirt2RNAiT7R (Tableau 1) afin d'introduire la séquence d'un promoteur T7 sur les brins sens et anti-sens du fragment. Les ARN double brins ont été synthétisés et purifiés à l'aide du MEGAscript® RNAi Kit (Ambion®) suivant les instructions du fabricant. En parallèle, un contrôle ciblant la luciférase a été préparé de la même manière. Les ARN double brins (25 µg) sont mis en contact avec 8 couples de vers dans des cuvettes de 0.4 cm de largeur et incorporés par électroporation en délivrant un pulse unique de 125 Volts pendant 20 millisecondes. Les vers ont ensuite été transférés dans 4 mL de milieu M199 complet pendant 5 jours. Le dernier jour d'incubation, les vers interférés sont récupérés. La moitié des vers est fixée dans un tampon AFA (95% éthanol, 3% formaldéhyde, 2% acide acétique) pour réaliser l'analyse morphologique par microscopie confocale à balayage laser, tandis que l'autre moitié sera utilisée pour déterminer le taux de transcrits de *SmSirt2* par PCR quantitative en temps réel.

Analyse phénotypique par microscopie confocale à balayage laser

Après fixation des vers adultes dans un tampon AFA, les parasites sont colorés pendant 30 minutes dans une solution de rouge carmin hydrochlorique à 2.5% final (Certistain®, Merck). Les vers sont ensuite décolorés dans une solution d'acide chlorhydrique contenant 70% d'éthanol avant d'être déshydratés pendant 5 minutes dans des solutions d'éthanol (70%, 90% puis 100%). Pour finir, les parasites sont placés entre lame et lamelle dans un liquide de montage Canada Balsam (Merck). L'observation des lames est réalisée à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser Leica TCS SP2 (Laser He/Ne 488nm, filtre 470nm).

Extraction d'ARNm et PCR quantitative en temps réel

Les ARNm des vers adultes interférés ont été extraits à l'aide du TRIzol® reagent (Invitrogen) suivant les instructions du fabricant. Les ARNm ont ensuite été purifiés à l'aide d'un traitement à la DNase (Turbo DNA-free Kit, Ambion). L'ADN complémentaire a été obtenu par rétro-transcription en utilisant le kit Thermoscript™ RT-PCR System (Invitrogen) avant d'être utilisé comme matrice pour une amplification utilisant le SYBR® Green PCR Mix et un système de détection ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems). Les amorces SmSirt2qPCRF et SmSirt2qPCRR (Tableau 1) ont été utilisées pour l'amplification de *SmSirt2* dans 3 expériences indépendantes. Le transcrit de l' α -tubuline a été utilisé comme standard interne.

Les résultats sont présentés sous forme de graphiques et le ratio d'expression a été calculé en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [Pfaffl, 2001].

Modélisation et Analyse structurale de SmSirt2

Dans le but d'étudier les interactions entre SmSirt2, son substrat, son cofacteur et des inhibiteurs potentiels, nous avons généré un modèle structural de l'enzyme. La séquence de SmSirt2 (code UniProtKB: G4VRA) a été obtenue dans la base de données UniProt [<http://www.uniprot.org/>]. Cette séquence a été utilisée pour rechercher des séquences homologues chez d'autres organismes par BLAST [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>]. La structure cristallographique de Sirt2 humaine (Code PDB: 1J8F.pdb, résolution 1.7 Å) utilisée a été obtenue à partir de la banque de données Protein Data Bank (PDB) [<http://www.rcsb.org/pdb/>]. Par homologie, cinq modèles de SmSirt2 ont été obtenus en utilisant MODELLER 9v8 [Sali et Blundell, 1993]. Le modèle final de SmSirt2 a été choisi en tenant compte des similarités de conformation entre SmSirt2 et Sirt2 humaine. Ce modèle a ensuite été optimisé en diminuant l'énergie du champs de force à l'aide du programme AMBER99 force field [Case *et al.*, 2005]. La qualité de la stéréochimie du modèle a été étudiée en utilisant le programme PROCHECK [Laskowski *et al.*, 1993].

Oligonucléotides

Oligonucléotides	Utilisation	Sequences (5'→3')
SmSirt2FLF	5' transcrit Full length	GGATATCCATATGTCTTTTCGACTTTTTGGGG
SmSirt2FLR	3' transcrit Full length	CGCGGATCCTCATTGCCCATTAGTTTTGTC
SmSirt2RNAiF	dsARN Forward	CAGGTTACTTCATGACAAAGGC
SmSirt2RNAiR	dsARN Reverse	GCCCATTAGTTTTGTCTTGGG
SmSirt2RNAiT7F	T7 dsARN Forward	TAATACGACTCACTATAGGGAGCAGGTTACTTCATGACAAAGGC
SmSirt2RNAiT7R	T7 dsARN Reverse	TAATACGACTCACTATAGGGAGGCCCATTAGTTTTGTCTTGGG
SmSirt2qPCRF	qPCR Forward	ATTACTTCCGACGCGATCCC
SmSirt2qPCRR	qPCR Reverse	AACGTAGGCTTTGCTTCTGGTC

Tableau 1: Liste des oligonucléotides utilisés

III Résultats

Optimisation de l'expression de SmSirt2 recombinante

Pour caractériser le rôle de SmSirt2, nous avons, dans un premier temps, étudié son activité enzymatique. Pour ce faire, nous avons optimisé l'expression de la protéine SmSirt2 dans des bactéries *E. coli* afin d'élaborer un protocole robuste pour mettre en place sa production

et sa purification à grande échelle. Ce protocole a été utilisé pour l'expression et la purification de la protéine entière ainsi que pour sa version tronquée (SmSirt2 N1C1) (Fig 3)

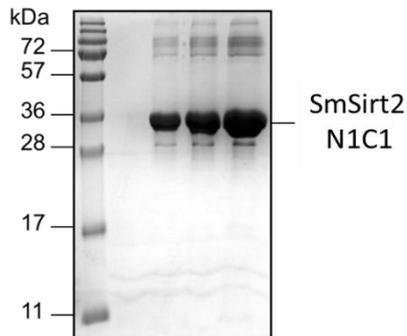


Figure 3: Analyse de la qualité de la purification de SmSirt2-N1C1 recombinantes par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie.

Détection de SmSirt2 à tous les stades de développement de *S. mansoni*

Après avoir mis en évidence la présence du transcrite de SmSirt2 à tous les stades parasitaires de *S. mansoni* [Lancelot *et al.*, 2013] (Partie I des résultats), nous avons envisagé de mettre en évidence la présence de la protéine SmSirt2 dans les stades miracidium, sporocyste, cercaire, schistosomule et adulte. Ainsi, l'anticorps polyclonal, obtenu après immunisation de souris avec la protéine recombinante SmSirt2, nous a permis de montrer par Western Blot que la protéine SmSirt2 est présente dans tous les stades de développement du parasite (Fig 4).

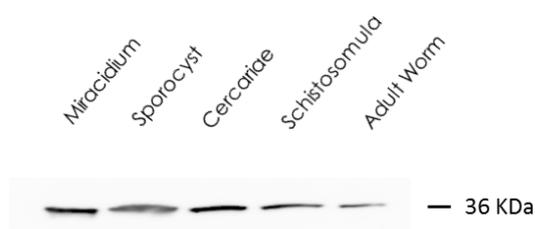


Figure 4: Western Blot contre la protéine native SmSirt2 dans les stades miracidium, sporocyste, cercaire, schistosomule et adulte de *S. mansoni*. La détection est réalisée en utilisant un anticorps primaire polyclonal dirigé contre SmSirt2 (dilution 1:1000) et un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de souris couplé à la peroxydase (dilution 1:50000) sur 50 µg d'extrait de protéines totales.

Mesure de l'activité enzymatique de SmSirt2 recombinante et inhibition

La mesure de l'activité désacétylase de SmSirt2 recombinante ainsi que celle de sa version tronquée est basée sur l'utilisation d'un dosage fluorimétrique mis au point dans le laboratoire du Pr. Manfred Jung [Heltweg *et al.*, 2003]. Les résultats obtenus montrent que la protéine SmSirt2 recombinante présente une activité désacétylase vis-à-vis du substrat non peptidique qui est utilisé dans ce dosage. Cependant, pour une même concentration en

enzyme et dans des conditions de dosage identiques, SmSirt2 présente une activité catalytique plus faible que son homologue humain HsSirt2. Néanmoins, l'étude de l'activité enzymatique de SmSirt2 recombinante est donc possible dans ces conditions de dosage mais nécessite l'utilisation d'une quantité importante d'enzyme.

Dans le but de compléter notre analyse sur l'activité enzymatique de SmSirt2, nous avons envisagé d'étudier son inhibition par des inhibiteurs génériques des sirtuines humaines. Ainsi, nous avons déterminé les IC_{50} de plusieurs inhibiteurs de sirtuines sur l'enzyme recombinante SmSirt2 en utilisant le dosage fluorimétrique précédemment décrit. Les inhibiteurs utilisés (Fig 5) sont pour la plupart des dérivés de thiobarbiturate (MS3, MS13, MC3438, MC3422 et MC3443). L'inhibition de l'activité désacétylase de SmSirt2 a également été étudiée en utilisant le nicotinamide et la sanguinarine. La détermination des valeurs des IC_{50} nous a permis de montrer que tous les inhibiteurs génériques des sirtuines humaines étaient également capables d'inhiber l'activité catalytique de SmSirt2. Cependant, certains composés comme le MS3, le MC3422 et la sanguinarine présentent une activité inhibitrice plus importante que les autres composés testés, avec une valeur d' IC_{50} inférieure à 10 μ M (Fig 5A).

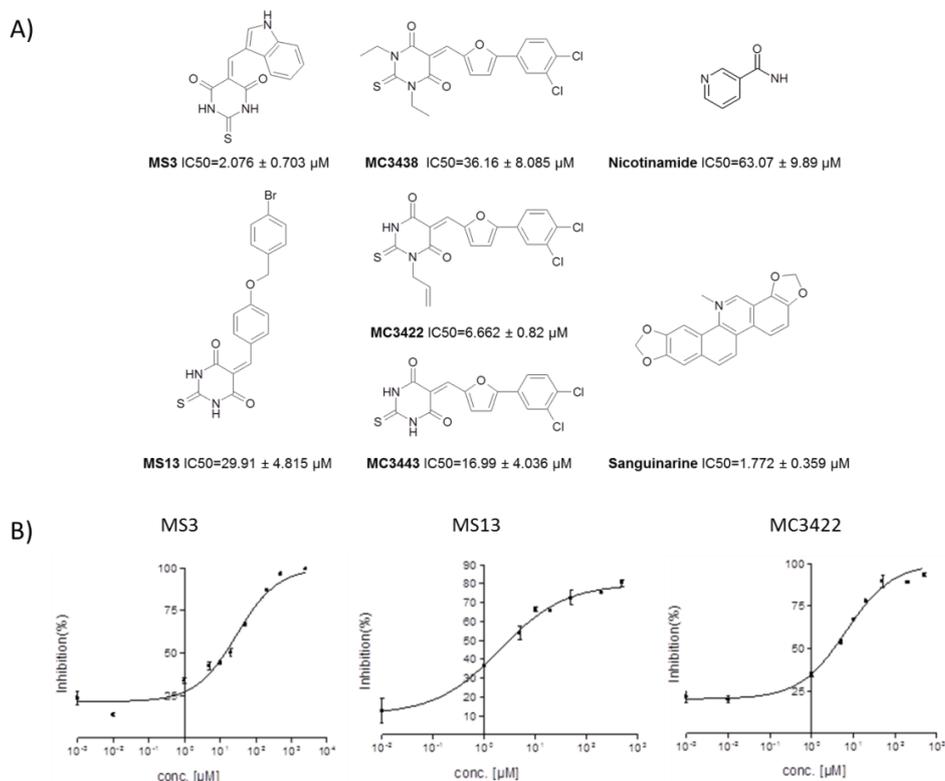


Figure 5: Détermination des IC_{50} de différents inhibiteurs génériques de sirtuines humaines sur l'enzyme recombinante SmSirt2. (A) Structure et valeurs des IC_{50} de dérivés thiobarbiturate (MS3, MS13, MC3438, MC3422 et MC3443), du nicotinamide et de la sanguinarine. (B) Représentation graphique des courbes d'inhibition de SmSirt2 par des dérivés thiobarbiturate obtenus par dosage fluorimétrique.

Identification d'inhibiteurs de SmSirt2 par criblage à haut débit

Dans le but d'identifier des inhibiteurs de SmSirt2, nous avons mis au point et réalisé un criblage à haut débit et testé environ 80 000 composés sur l'enzyme recombinante. Le premier criblage réalisé a permis de mettre en évidence une liste de 875 composés qui présentent une activité inhibitrice sur SmSirt2 à une concentration de 10 μM . Pour 848 composés, nous avons étudié leur affinité pour SmSirt2 en établissant des courbes dose-réponse à l'aide d'un dosage fluorimétrique. Les résultats obtenus ont permis de confirmer une activité inhibitrice dose-dépendante pour 764 composés. La détermination des IC_{50} de ces inhibiteurs ont permis de montrer que 9 composés présentent une IC_{50} inférieure à 0,1 μM , 111 possèdent une IC_{50} inférieure à 1 μM et 646 composés ont une IC_{50} inférieure à 10 μM . Afin de diminuer ce nombre et d'éviter certains artefacts liés au dosage, les composés susceptibles d'interférer avec la mesure de la fluorescence et ceux présentant une activité redox ont été retirés de la liste. Les composés restants ont fait l'objet d'un contrôle qualité afin de vérifier leur pureté, leur stabilité ainsi que leur solubilité dans le tampon utilisé pour le dosage. Les composés ayant passé ce contrôle qualité ont été classés en fonction de leur structure. Ainsi, nous avons pu identifier 165 séries de composés et 159 molécules qui ne présentent aucune similarité de structure. Une évaluation des composés par des chimistes médicaux de la société suédoise Kancera AB a permis d'identifier les plus prometteurs. L'évaluation est basée sur une étude des relations structure-activité des composés ainsi que sur leur brevetabilité. Ainsi, ce criblage a été poursuivi avec 6 séries de composés et 4 molécules isolées afin d'identifier des analogues dans une chimiothèque répertoriant plus de 2 millions de molécules. Cette nouvelle étape a permis d'identifier 551 composés analogues pour lesquels nous avons établi des courbes dose-réponse et réalisé un contrôle qualité. Ces composés ont de nouveau été classés en fonction de leur structure et 6 séries présentent un nombre élevé de molécules actives sur SmSirt2 (Tableau 2).

Série	Nombre d'analogues	Nombre de composés avec DR	IC_{50} (μM)
1	59	17	0.042 – 20
10	201	73	0.032 – 58
19	127	53	0.094 – 45
21	104	26	0.51 – 33
38	29	21	0.13 – 30
39	38	22	0.27 – 7.0
S40556	37	2	0.67 – 11
S141412	22	2	3.1 – 11
S257476	13	2	0.098 – 1.5
S379111	7	4	1.2 – 44

Tableau 2: Récapitulatif des 10 groupes de composés identifiés lors du criblage à haut débit sur SmSirt2. Le nombre de composés identifiés dans chaque groupe est indiqué ainsi que le nombre de composés pour lesquels nous avons pu établir une courbe dose-réponse (DR). Une fourchette de la valeur des IC₅₀ en µM est également mentionnée.

Etude de la cytotoxicité des inhibiteurs de SmSirt2 sur des lignées cellulaires humaines

Dans chaque groupe de molécules, nous avons étudié la cytotoxicité des inhibiteurs de SmSirt2 présentant une IC₅₀ inférieure à 1 µM sur différentes lignées cellulaires au moyen d'un dosage fluorimétrique. Les résultats obtenus montrent que, globalement, les composés identifiés sont peu toxiques pour les cellules cancéreuses et les fibroblastes (Tableau 3). De plus, parmi toutes les molécules testées, 39 d'entre elles sont capables d'augmenter leur viabilité. Le tableau ci-dessous présente les inhibiteurs de SmSirt2 qui ont été sélectionnés afin d'étudier *in vitro* leur toxicité vis-à-vis des schistosomules et des vers adultes de *S. mansoni*.

Composés	Série	IC ₅₀ (nM)	Viabilité FB (%) à 20 µM	Viabilité HepG2 (%) à 20 µM	Viabilité U-2 OS (%) à 20 µM
A	S257476	98	59	78	64
B	21	651	50	80	53
C	1	42	84	80	63
D	10	32	93	106	104
E	19	186	106	101	99
F	39	382	131	130	121
G	S379111	985	90	96	99

Tableau 3: Cytotoxicité de différents inhibiteurs de SmSirt2 sur différentes lignées cellulaires humaines. Fibroblastes (FB), cellules cancéreuses hépatiques (HepG2) et cellules cancéreuses osseuses (2 OS). La viabilité des cellules est exprimée en % par rapport aux cellules traitées avec du DMSO.

Les inhibiteurs de SmSirt2 affectent *in vitro* la viabilité des schistosomules.

Dans le but de valider SmSirt2 comme une cible thérapeutique potentielle, nous avons réalisé un criblage haut débit sur l'enzyme recombinante afin d'identifier des inhibiteurs présentant une affinité élevée pour SmSirt2. Parmi ces inhibiteurs, 4 composés qui présentent une IC₅₀ de l'ordre du nM ont été testés *in vitro* afin d'évaluer leur toxicité sur des schistosomules maintenus en culture. Pour ce faire, des schistosomules ont été traités quotidiennement avec ces inhibiteurs pendant 5 jours. La mortalité des parasites a été

évaluée chaque jour, sous microscope, en fonction de trois critères: l'absence de mobilité, l'apparition de dommages au niveau du tégument ainsi que l'apparence granuleuse des parasites. Les résultats obtenus montrent que les 4 inhibiteurs testés sont capables d'induire la mort des schistosomules de manière dose et temps dépendante (Fig 6). A 5 μM , après 5 jours de traitement, les composés A et C induisent la mort de toutes les larves alors que les composés B et D sont moins toxiques à cette concentration et entraînent respectivement une réduction de la viabilité de 78% et 69%. A 20 μM , le composé A est le plus toxique et permet d'induire la mort de toutes les larves après 1 jour de traitement alors que 3 jours sont nécessaires pour les composés B et C. A la même concentration, le composé D induit la mort de toutes les larves après 5 jours de traitement.

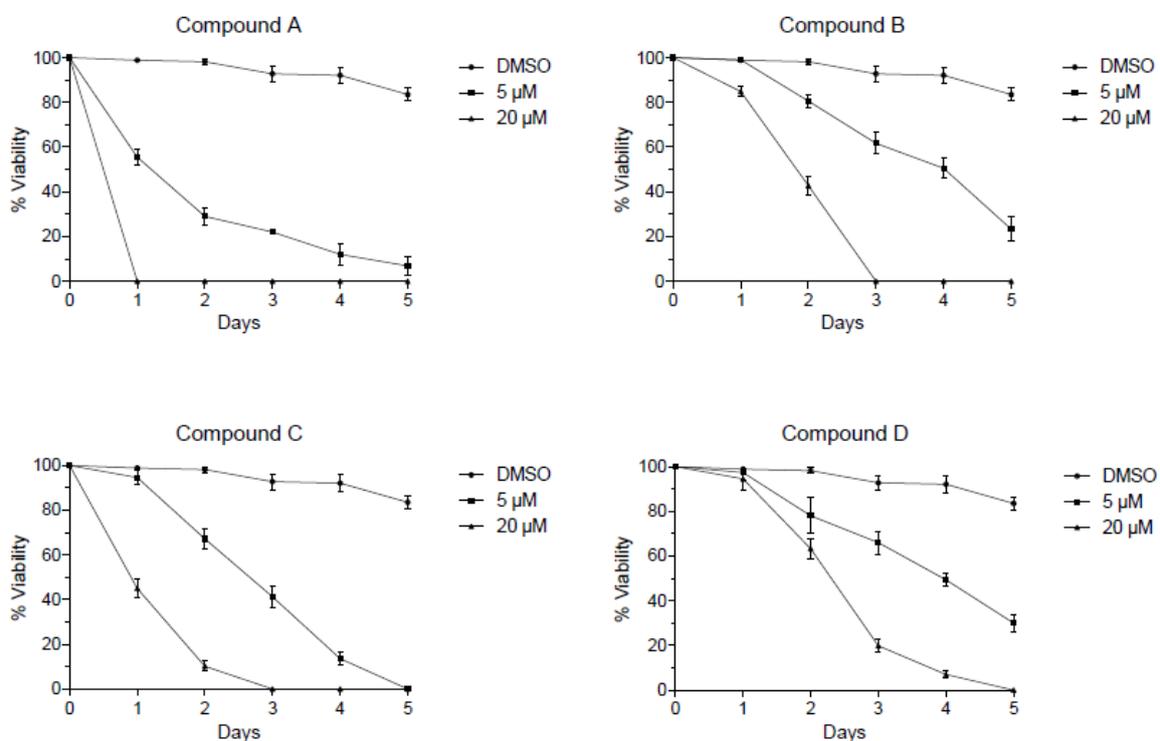


Figure 6: Viabilité des schistosomules maintenus en culture pendant 5 jours et traités ou non avec 5 μM et 20 μM de différents inhibiteurs de SmSirt2 (composé A, B, C et D). Les larves mortes présentent un aspect opaque, une apparence granuleuse ainsi que des dommages au niveau du tégument. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité des larves (\pm SEM, 3 expériences indépendantes).

Les inhibiteurs de SmSirt2 affectent *in vitro* la stabilité de l'accouplement et la production des œufs des vers adultes.

Pour déterminer l'effet d'inhibiteurs de SmSirt2, *in vitro*, sur des vers adultes, nous avons décidé d'étudier la stabilité de l'accouplement des vers et de quantifier le nombre d'œufs

produits au cours du traitement. Dans ces expériences, les vers adultes ont été mis en culture en présence ou non d'inhibiteurs de SmSirt2 pendant 5 jours. Les composés étudiés (Composés A, B, C et D) ainsi que leurs concentrations (5 et 20 μM) sont identiques à ceux utilisés pour l'étude de la viabilité des schistosomules précédemment décrite. Les résultats indiquent que les 4 composés testés affectent à 20 μM la stabilité de l'accouplement des vers adultes au cours du traitement, et ce, de manière temps et dose dépendante (Fig 7). En effet, à cette concentration, le composé A induit un désappariement total des vers en 2 jours alors qu'il faut 3 jours pour le composé C et 4 jours pour le composé B pour obtenir le même effet. Le composé D utilisé à 20 μM , induit en moyenne, le désappariement de 8 couples sur 10 après 5 jours de traitement comparativement au contrôle où les vers sont uniquement traités au DMSO. A 5 μM , seul le composé A présente un effet sur la stabilité de l'accouplement des vers et tous les couples sont séparés après 3 jours de traitement. Aucun effet n'a été observé à cette concentration pour les composés B, C et D.

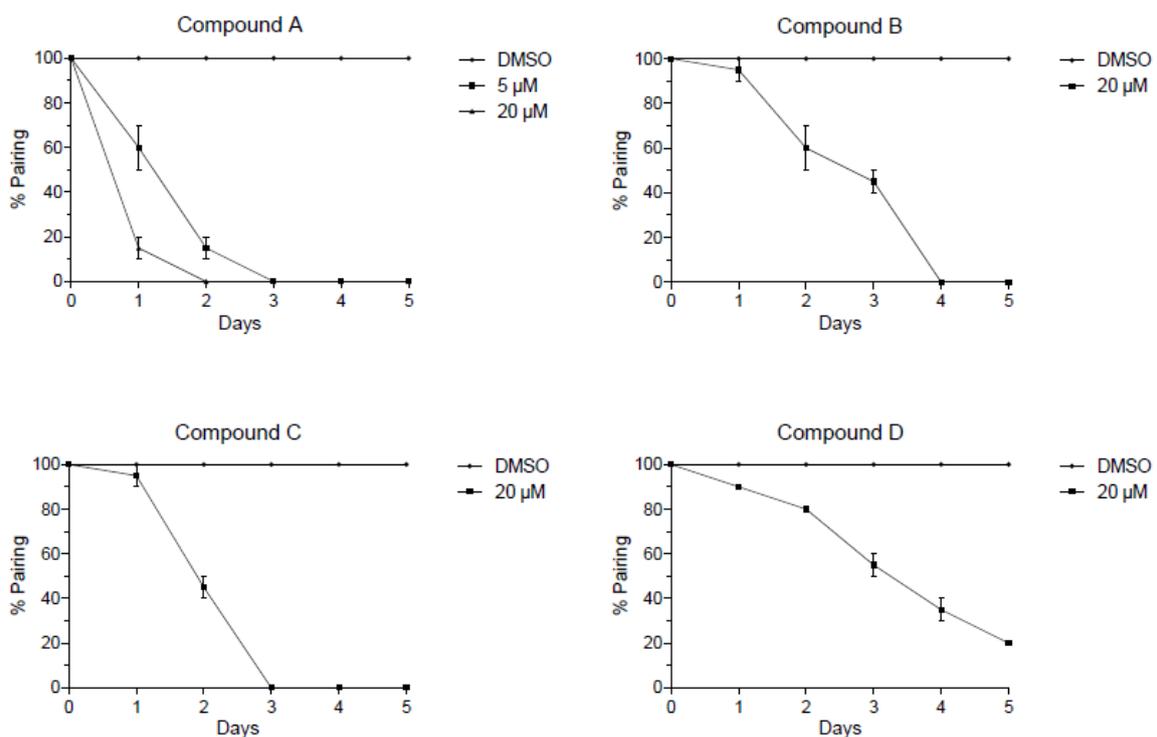


Figure 7: Des vers adultes obtenus après perfusion sont maintenus en culture pendant 5 jours et incubés ou non avec différents inhibiteurs de SmSirt2 (composé A, B, C et D) à 5 μM et 20 μM . Le DMSO a été utilisé comme contrôle. Le pourcentage de vers appariés a été déterminé quotidiennement. Les résultats sont exprimés en % de vers accouplés comparativement aux vers traités uniquement au DMSO (\pm SEM, 3 expériences indépendantes).

Ensuite, nous avons étudié l'effet des inhibiteurs de SmSirt2 sur la production des œufs par la femelle adulte du schistosome après 5 jours de traitement. Les résultats obtenus montrent que les composés A, B, C et D entraînent une diminution du nombre d'œufs pondus de

manière dose dépendante au cours du traitement comparativement aux vers contrôles traités uniquement au DMSO (Fig 8). A 5 μM , le composé A induit une réduction de 95 % du nombre total d'œufs pondus au cours du traitement alors que les composés B et C induisent une diminution d'environ 50 % de la production d'œufs comparativement aux vers contrôles. A la même concentration, le composé D est moins efficace et entraîne une diminution de 20 % de la production des œufs (Fig 8A). Le traitement avec 20 μM des composés A, B et C entraîne une diminution drastique du nombre d'œufs pondus (>95%). Le composé D, à la même concentration, induit une diminution d'environ 80% de la production d'œufs par la femelle schistosome (Fig 8B).

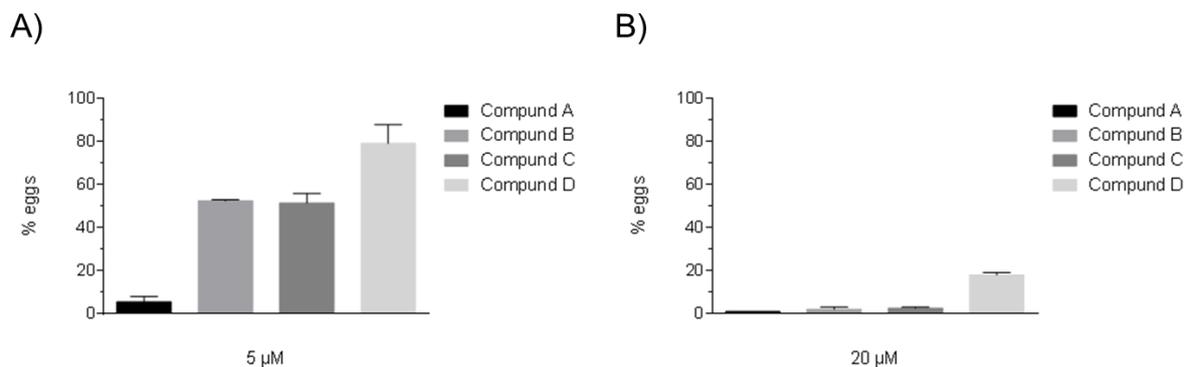


Figure 8: Nombre total d'œufs pondus pendant 5 jours de traitement avec des inhibiteurs de SmSirt2 (Composés A, B, C et D) à 5 μM (A) et 20 μM (B). Les résultats obtenus sont exprimés en % du nombre total d'œufs pondus par les vers traités comparativement aux vers contrôles traités uniquement au DMSO (\pm SD, 3 expériences indépendantes).

Pour compléter ces résultats, nous avons analysé par microscopie confocale à balayage laser l'effet phénotypique sur le tégument et les organes reproducteurs de vers adultes traités pendant 5 jours avec le composé A à une concentration de 20 μM . Les résultats obtenus montrent que cet inhibiteur de SmSirt2 induit un effet significatif sur la morphologie de l'ovaire et des testicules ainsi qu'une altération du tégument. Les vers adultes mâles, non traités, présentent des testicules composés de plusieurs lobes qui contiennent un nombre important de spermatocytes (Fig 9B). Chez la femelle, l'ovaire est composé d'ovocytes immatures dans sa partie antérieure, et d'ovocytes matures dans sa partie postérieure (Fig 9A). Cependant, après un traitement avec le composé A, nous avons observé après 5 jours, une diminution significative du nombre de cellules germinales au sein des testicules du mâle (Fig 9E) ainsi qu'une désorganisation de l'ovaire chez la femelle, où les ovocytes matures sont présents en très grand nombre et semblent envahir complètement l'ovaire (Fig 9D). De plus, nous avons pu montrer qu'à 20 μM , le composé A induit une altération importante du tégument des vers adultes mâles (Fig 9F) comparativement aux vers non traités (Fig 9C).

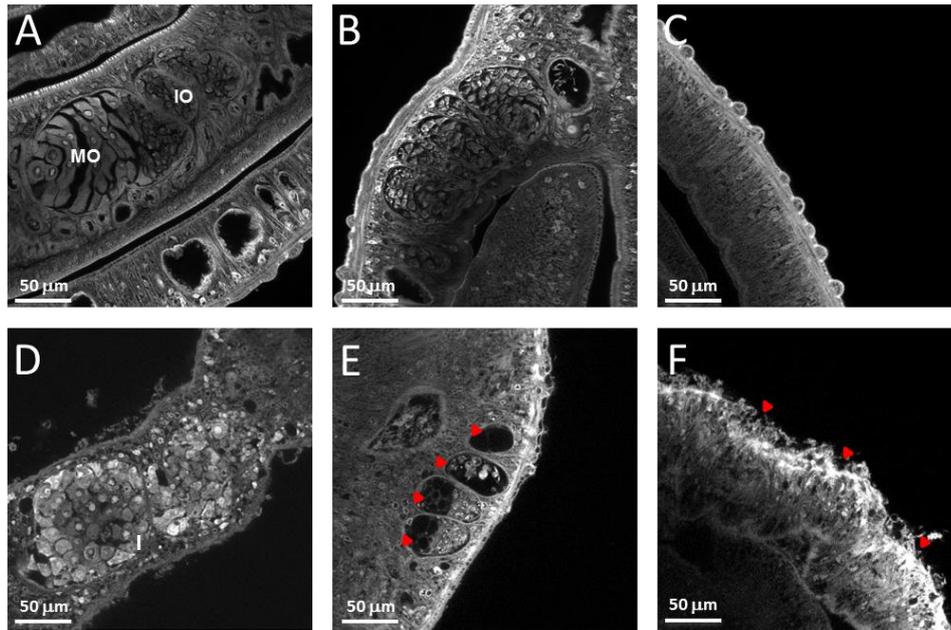


Figure 9: Observation par microscopie confocale à balayage laser de vers adultes après traitement pendant 5 jours avec le composé A à 20 µM. Les vers ont été fixés et colorés au rouge carmin. (A) Ovaire d'une femelle non traitée avec des ovocytes immatures (IO) dans sa partie antérieure et des ovocytes matures (MO) dans sa partie postérieure. (B) Testicule d'un ver mâle non traité composé de plusieurs lobes contenant un grand nombre de spermatocytes. (C) Tégument d'un ver mâle non traité. Le traitement avec le composé A induit une désorganisation importante de l'ovaire (D), une diminution significative du nombre de spermatocytes dans le testicule (E) ainsi qu'une altération du tégument chez le mâle (F).

Invalidation du transcrit *SmSirt2* par ARN interférence chez le ver adulte

Dans le but d'étudier le rôle potentiel de *SmSirt2* dans la reproduction des vers adultes de schistosome, nous avons réalisé l'invalidation du gène codant pour cette enzyme par la technique d'ARNi puis analysé par microscopie confocale à balayage laser l'effet phénotypique de cette invalidation sur les testicules et l'ovaires de vers adultes. Les résultats obtenus montrent que l'interférence de *SmSirt2* a permis de diminuer d'environ 70 % le niveau d'expression des transcrits codant *SmSirt2* chez des vers adultes maintenus en culture pendant 5 jours (Fig 10A). Cependant, l'observation des organes reproducteurs des vers adultes (Fig 10B) n'a pas permis de mettre en évidence un effet phénotypique significatif au niveau des testicules et de l'ovaire des vers adultes interférés pour *SmSirt2*.

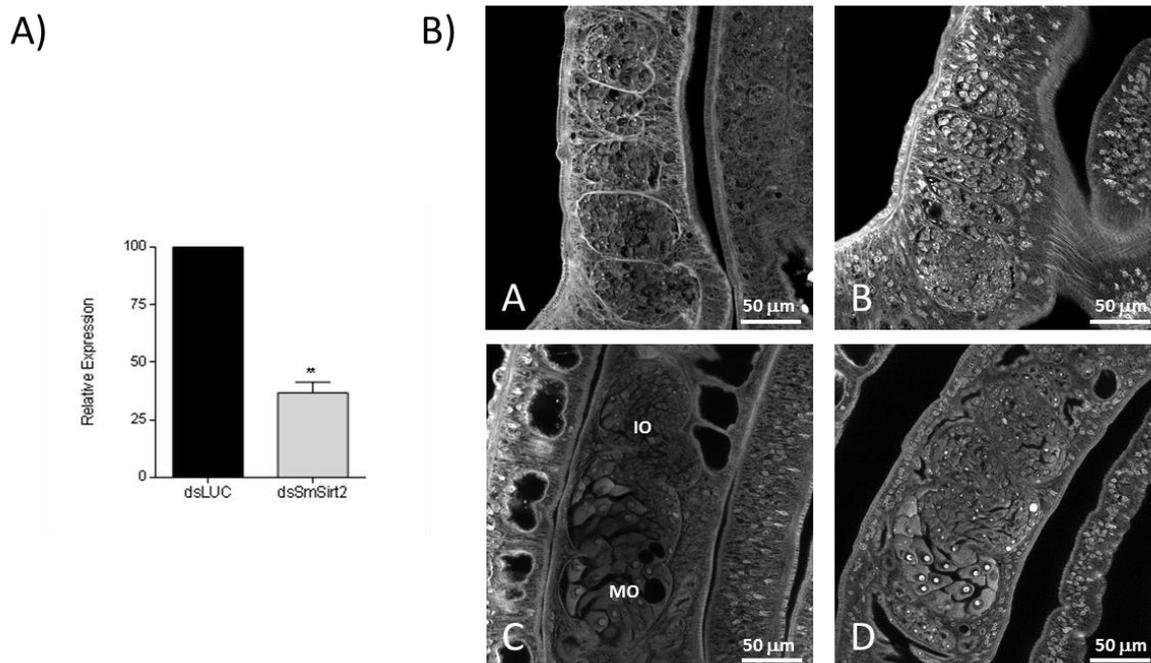


Figure 10: Effet de l'invalidation du transcrit *SmSirt2* sur des vers adultes. La technique d'ARN interférence a été réalisée par électroporation de vers adultes avec des dsARN dirigés contre *SmSirt2* ou *luciférase* (contrôle négatif). (A) L'interférence a permis de réduire d'environ 70 % le niveau d'expression du gène codant *SmSirt2*. (B) Observation par microscopie confocale, 5 jours après l'incorporation de dsARN. Les images A et B montrent les testicules de vers mâles interférés pour *luciférase* et pour *Sirt2* respectivement. Les images C et D montrent des ovaires de vers femelles interférés pour *luciférase* et pour *Sirt2* respectivement.

Modélisation structurale de *SmSirt2* et identification d'inhibiteurs par criblage *in silico*

L'optimisation de l'expression de *SmSirt2* en bactérie *E. coli*, nous a permis d'obtenir une protéine soluble et enzymatiquement active. Néanmoins, à ce jour il n'a pas été possible de déterminer la structure cristallographique de l'enzyme par diffraction aux rayons X. Une des stratégies mise en place pour identifier des inhibiteurs de *SmSirt2 in silico* a consisté à réaliser un modèle structural de *SmSirt2* par homologie avec la structure cristallographique de *Sirt2* humaine. La modélisation de *SmSirt2* nous a permis de comparer sa structure à celle déjà établie de l'enzyme humaine, complexée avec un inhibiteur (Fig 11A). La superposition des deux structures nous montre que les acides aminés qui composent les sites actifs de ces deux enzymes sont très similaires. Cette observation suggère donc que la fixation du substrat ainsi que celle de l'inhibiteur seront identiques entre l'enzyme humaine et celle du schistosome. Cependant, nous avons identifié des différences notables dans le site de fixation du substrat acétylé dans lequel les résidus I169, I232, F234 et L239 de *Sirt2* humaine sont remplacés respectivement en résidus V132, V193, L195 et M200 dans *SmSirt2*. Ces différences structurales pourront être exploitées afin d'optimiser chimiquement

des inhibiteurs pour les rendre spécifiques de SmSirt2. Dans le but d'identifier et d'optimiser des inhibiteurs de SmSirt2, nous avons réalisé un modèle d'interaction entre l'enzyme et le dérivé thiobarbiturate MS3 (Fig 11B). Ainsi, nous avons pu montrer que l'inhibiteur permet de bloquer l'accès du substrat à son site de fixation dans le site catalytique de SmSirt2.

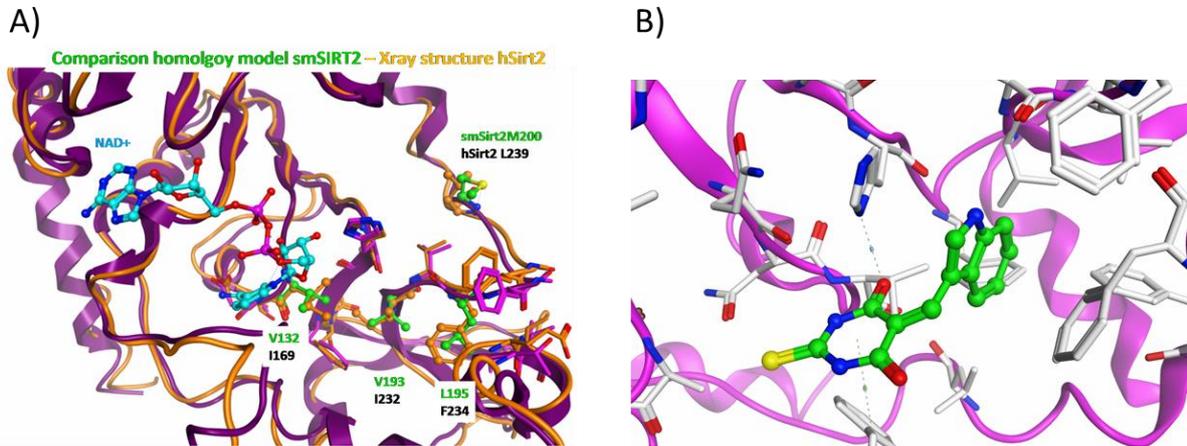


Figure 11: Modélisation de la structure de SmSirt2. (A) Comparaison de la structure de Sirt2 humaine (orange) avec le modèle établi pour la structure de SmSirt2 (magenta). Le cofacteur, NAD⁺ est coloré en bleu. Les résidus du site actif qui diffèrent entre les deux enzymes sont indiqués. (B) Modèle d'interaction du dérivé thiobarbiturate MS3 (vert) au niveau du site actif de SmSirt2.

IV Discussion

L'analyse *in silico* du génome de *S. mansoni* nous a permis de mettre en évidence et de caractériser 5 gènes codant pour des homologues de sirtuines humaines [Lancelot *et al.*, 2013]. Au cours de ce travail, nous avons focalisé nos recherches sur SmSirt2 afin d'étudier son rôle potentiel comme cible thérapeutique dans le traitement de la schistosomiase. Dans un premier temps, nous avons envisagé l'expression de SmSirt2 sous forme de protéine recombinante dans des bactéries *E. coli*. L'optimisation des conditions d'expression nous a permis d'établir un protocole robuste permettant de réaliser à grande échelle la production et la purification de SmSirt2 ainsi que celle d'une version tronquée, SmSirt2-N1C1. A la suite de ce travail, nous avons souhaité déterminer la structure cristallographique de l'enzyme par diffraction aux rayons X. Cependant, malgré des efforts importants pour déterminer les conditions optimales de cristallisation, aucun cristal de la protéine n'a pu être obtenu à ce jour [Communication personnelle de Martin Marek]. Néanmoins, nous avons montré que l'utilisation d'un dosage fluorimétrique, mis au point pour étudier l'activité enzymatique des sirtuines humaines, permettait également d'étudier celle de SmSirt2. Les résultats obtenus montrent que la protéine SmSirt2 présente une activité désacétylase. Cependant, ce dosage nécessitait l'utilisation d'une quantité importante d'enzyme dans les conditions initiales. Pour pallier cet inconvénient, les conditions du dosage ont été optimisées afin d'augmenter

l'activité enzymatique de SmSirt2. Ainsi, nous avons montré que l'ajout de Triton X-100 et de DTT (Dithiothréitol) dans le tampon du dosage permet d'augmenter l'activité catalytique de SmSirt2 et de diminuer d'un facteur 50 la consommation d'enzyme. De plus, les volumes de réactifs utilisés ont été diminués. L'optimisation des conditions de dosage nous a permis d'envisager son utilisation afin de réaliser un criblage à haut débit d'inhibiteurs de sirtuines humaines sur l'enzyme recombinante SmSirt2. Ce dosage fluorimétrique, nous a permis en outre, de déterminer les IC₅₀ de plusieurs inhibiteurs génériques des sirtuines humaines (dérivés thiobarbituriques, nicotinamide et sanguinarine) sur l'enzyme SmSirt2 recombinante. Cependant, pour certains composés tels que la salermide ou le sirtinol, l'utilisation de ce dosage fluorimétrique n'as pas permis de déterminer leurs IC₅₀ car pour des concentrations élevées, les composés sont insolubles et précipitent dans le tampon.

Par ailleurs, l'optimisation des conditions de dosage par le Dr Johan Schultz, nous a permis de réaliser un criblage à haut débit sur une chimiothèque de plus de 80 000 composés appartenant à la société Kancera AB. Ce criblage a permis d'identifier des composés de natures chimiques différentes qui ont été classés en fonction de leurs structures en 6 séries. Ces différentes séries regroupent un nombre important de molécules actives sur SmSirt2 avec des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre du nM pour certaines d'entre elles. A la suite de ce criblage, la cytotoxicité des composés les plus prometteurs a été évaluée sur différentes lignées cellulaires humaines au moyen d'un dosage fluorimétrique. Ainsi, nous avons montré que les inhibiteurs de SmSirt2 identifiés sont peu toxiques et que certains d'entre eux, permettent même d'augmenter la viabilité des cellules humaines. Néanmoins, il se peut que cette augmentation soit un artéfact dû à une inhibition d'une ou plusieurs sirtuines humaines entraînant une hyper-acétylation des histones et, par conséquent, une surexpression des NO-synthétase dans les lignées cellulaires étudiées.

Les molécules les moins toxiques ont été sélectionnées et ont fait l'objet de tests *in vitro* afin d'évaluer leur toxicité sur des parasites maintenus en culture. Ainsi, nous avons démontré que certains composés affectent la viabilité des schistosomules ainsi que la stabilité et la production d'œufs des vers adultes. Cependant, même si l'utilisation de ces différents composés à une concentration de 5 µM s'avère être toxique pour les schistosomules, elle ne présente aucun effet sur la stabilité de l'appariement des vers adultes et ne provoque qu'une diminution modérée de la production des œufs. A ce jour, seuls quelques composés, identifiés par criblage à haut débit, ont été testés *in vitro* sur des parasites en culture. Cette étude devra être étendue à d'autres molécules afin d'identifier celles qui permettent, à de faibles concentrations, d'obtenir un effet significatif sur les schistosomules et les vers adultes. A la suite de ces expériences, les molécules les plus toxiques pour le schistosome seront optimisées chimiquement afin d'augmenter leur spécificité pour l'enzyme du parasite

et d'améliorer leurs caractéristiques pharmacocinétiques en vue d'une administration chez l'homme. L'optimisation de ces composés nous permettra aussi, d'identifier des précurseurs potentiels de médicaments qui feront l'objet d'une étude *in vivo* afin de déterminer leurs effets dans un modèle de souris infectées par le schistosome.

Pour finir, dans cette étude, nous avons envisagé d'étudier le rôle de SmSirt2 dans la reproduction des vers adultes de schistosome par l'invalidation du transcrite de SmSirt2 par ARN interférence. Cependant, malgré une diminution de 70 % de l'expression du transcrite de SmSirt2, l'analyse phénotypique des organes reproducteurs du schistosome réalisée par microscopie confocale à balayage laser, n'a pas permis d'observer de changement morphologique au niveau du testicule et de l'ovaire du parasite. Ces résultats préliminaires suggèrent que SmSirt2 n'est pas impliquée dans la spermatogénèse et l'ovogénèse chez le schistosome. Néanmoins, ces expériences devront être répétées afin de valider les résultats précédemment obtenus. Nous envisageons également d'interférer les transcrits de SmSirt1 et de SmSirt2 simultanément afin de mettre en évidence un potentiel effet synergique de cette invalidation sur la morphologie des organes reproducteurs du schistosome.

Partie 3: Identification des partenaires protéiques de SmSirt1 et mise au point d'un dosage enzymatique en ovocytes de xénope

I Introduction

Les sirtuines sont des HDAC(s) de classe III qui présentent une activité enzymatique dépendante du NAD⁺. Parmi les 7 isoformes (Sirt1-7) identifiés chez l'homme, Sirt1 est la plus étudiée. Les premières études, réalisées chez la levure ont montré que Sirt1 est impliquée dans la stabilité du génome et qu'elle permet d'augmenter la durée de vie des cellules [Kaeberlein *et al.*, 1999 ; Shore *et al.*, 1984]. Depuis, de nombreux travaux ont montré que Sirt1 est associée à de nombreuses pathologies humaines notamment dans les syndromes métaboliques, l'inflammation, la neurodégénérescence et les cancers [Haigis et Sinclair, 2010 ; Saunders et Verdin, 2007]. De par ses nombreuses fonctions biologiques chez l'homme, l'industrie pharmaceutique porte un intérêt grandissant à l'étude de Sirt1 en tant que cible thérapeutique. A ce jour, il est encore difficile de savoir si une modulation de l'activité de Sirt1 avec des activateurs ou des inhibiteurs permettra d'obtenir des effets thérapeutiques bénéfiques sans induire d'effets secondaires.

Chez l'homme, dans des pathologies spécifiques, il a été montré que Sirt1 régule ou interagit directement avec de nombreuses protéines [Sharma *et al.*, 2012]. Par exemple, il a été démontré, dans des cellules humaines, que DBC1 (Deleted in Breast Cancer 1) se fixe à Sirt1 et régule négativement son activité. Cette régulation a pour but d'augmenter le niveau d'acétylation de p53 pour induire l'apoptose. Par opposition, dans des expériences d'ARNi, les auteurs démontrent qu'une déplétion de *DBC1* stimule la désacétylation de p53 par Sirt1 afin d'inhiber l'induction de l'apoptose [Zhao *et al.*, 2008]. En 2004, Brunet *et al.*, rapportent que dans des conditions de stress oxydatif, Sirt1 forme un complexe protéique et désacétyle le facteur de transcription FoxO3. Ainsi, Sirt1 permet d'augmenter la capacité de FoxO3 à induire l'arrêt du cycle cellulaire et la résistance au stress oxydatif. Cette interaction permet également d'inhiber la capacité de FoxO3 à induire la mort cellulaire [Brunet *et al.*, 2004]. Dans une autre étude, il a été montré que Sirt1 présente une fonction dans l'homéostasie du glucose en interagissant et en désacétylant PGC-1 α (Peroxisome Proliferator-activated receptor-gamma Coactivator 1 alpha). Ainsi, Sirt1 induit l'expression de gènes impliqués dans la glycogénèse et la production de glucose hépatique [Rodgers *et al.*, 2005]. Dans la littérature, d'autres protéines ont été identifiées comme des partenaires protéiques de Sirt1. La figure 1 a été extraite de la base de données STRING 9.05 [Franceschini *et al.*, 2013] et regroupe les interactions directes (physiques) et indirectes (fonctionnelles) connues ou prédites, de Sirt1 avec différents partenaires protéiques (Fig 1). Plus récemment, une étude

in silico a permis de mettre en évidence de nombreux partenaires protéiques potentiels de Sirt1 [Sharma et 2012].

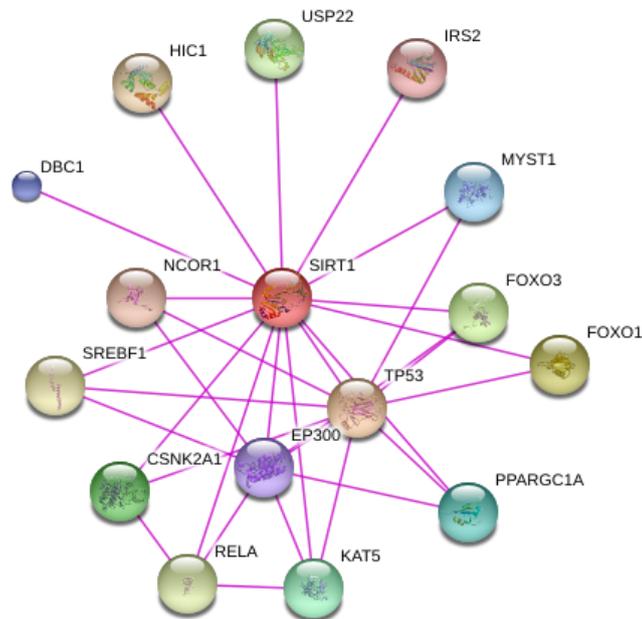


Figure 1: Interactions physiques et/ou fonctionnelles entre Sirt1 et différents partenaires protéiques chez l'homme. TP53 (Tumor Protein p53), FoxO1 (Forkhead box O1), FoxO3 (Forkhead box O3), CSNK2A1 (Casein Kinase 2), KAT5 (K (lysine) Acetyltransferase 5), PPARGC1A (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Coactivator 1 alpha), MYST1 (MYST histone acetyltransferase 1), DBC1 (Deleted in Breast Cancer 1), EP300 (microRNA 1281), IRS2 (Insulin Receptor Substrate 2), NCOR1 (Nuclear Receptor Co-Repressor 1), H1C1 (Hypermethylated in Cancer 1), SREBF1 (Sterol Regulatory Element Binding transcription Factor 1), RELA (v-rel Reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)), USP22 (Ubiquitin Specific Peptidase 22) [<http://string-db.org>].

A ce jour, chez le schistosome, aucune interaction physique entre SmSirt1 et d'autres protéines n'a été mise en évidence. Néanmoins, dans une étude réalisée au laboratoire, nous avons montré que SmSirt1 interagit fonctionnellement avec le facteur de transcription SmFoxO pour moduler l'activité transcriptionnelle de gènes cibles [Caby *et al.*, manuscrit en préparation]. Ainsi, dans le but d'identifier des partenaires protéiques de SmSirt1 chez *S. mansoni*, nous avons mis en place le criblage d'une banque d'ADNc de vers adultes par la technique du double hybride en levure afin d'identifier des partenaires protéiques potentiels. L'identification de ces partenaires permettra à plus long terme d'étudier la fonction de SmSirt1 chez le parasite.

Par ailleurs, au cours de ce projet de recherche, nous avons montré *in vitro*, que des inhibiteurs de sirtuines humaines induisent la mort de schistosomules et affectent la stabilité de l'appariement de vers adultes maintenus en culture [Lancelot *et al.*, 2013]. Pour consolider ces résultats et étudier le rôle de SmSirt1 dans la survie du parasite nous avons

envisagé d'étudier *in vitro* l'inhibition de cette enzyme par des inhibiteurs de sirtuines humaines tels que la salermide et le sirtinol. L'utilisation d'un dosage fluorimétrique, précédemment décrit pour SmSirt2, n'a pas pu être envisagée pour étudier l'activité enzymatique de SmSirt1 car, à ce jour, nous ne disposons pas de la protéine recombinante soluble et enzymatiquement active. Néanmoins, à partir d'un protocole décrit dans la littérature [Borra *et al.*, 2002], nous avons mis au point l'expression de SmSirt1 et étudié son inhibition par le sirtinol et la salermide dans un modèle hétérologue, couramment utilisé au laboratoire pour l'expression de protéines du schistosome: l'ovocyte de xénope. Dans leur article, Borra *et al.* s'intéressent à la production et à la fonction biologique de l'O-Acetyl-ADP-ribose, un des produits formés à la suite de la réaction de désacétylation d'un substrat par les sirtuines. Cette étude a permis de démontrer que Sir2 de levure ainsi que l'enzyme Sirt2 humaine génèrent de l'O-Acetyl-ADP-ribose *via* une réaction enzymatique conservée. De plus, il a été montré que l'injection d'O-Acetyl-ADP-ribose et celle d'ARNm de Sirt2 humaine dans des ovocytes d'étoile de mer induit un retard/blocage dans la maturation des ovocytes ainsi qu'un retard/blocage du cycle cellulaire dans le développement embryonnaire. Ainsi, à partir de ces résultats nous avons mis au point l'expression de SmSirt1 dans des ovocytes de xénope afin d'étudier l'inhibition de son activité enzymatique par des inhibiteurs de sirtuines humaines.

II Matériels et Méthodes

Double hybride en levure

Le criblage d'une banque d'ADNc de vers adultes a été réalisé en utilisant la technique de double hybride en levure dans le but d'identifier les partenaires protéiques de Sirt1 chez *S. mansoni*. La séquence codante de SmSirt1 a été amplifiée par PCR en utilisant la Taq polymérase Advantage 2 (Clontech) et les amorces SmSirt1FDH/SmSirt1RDH (Tableau 1). Le produit de PCR a été sous cloné dans un vecteur pCR2.1-TOPO (Invitrogen) et l'intégrité de la séquence a été vérifiée par séquençage (Eurofins MGW Operon). Ensuite, la séquence codante de SmSirt1 a été insérée entre les sites de restriction EcoRI et BamHI d'un vecteur pGBKT7 DNA-BD (Clontech) qui code pour une étiquette myc en position N-terminale. L'intégrité de la séquence a de nouveau été vérifiée par séquençage. Cette construction a été utilisée pour transformer des levures Y187 en utilisant de l'acétate de lithium selon les recommandations du fournisseur (Yeast Protocols Handbook, Clontech).

Les ANDc de la banque de vers adultes de *S. mansoni* ont été insérés par recombinaison homologue dans le vecteur pGADT7- rec (Clontech) qui code pour une étiquette HA en position N-terminale. Ces construits ont été utilisés pour transformer des levures AH109

[Quack *et al.*, 2009]. Ensuite, les levures Y187, qui expriment SmSirt1, ont été mises en contact avec les levures AH109 qui contiennent la banque d'ADNc. Après la fusion des levures, les diploïdes, dans lesquels se sont produites les interactions entre SmSirt1 et une protéine de la banque, sont sélectionnés sur un milieu sélectif dépourvu des acides aminés leucine, tryptophane, histidine et de la base nucléique adénine. Ensuite, les clones sélectionnés ont été déposés sur un papier filtre imbibé d'une solution de X-Gal afin de mettre en évidence une activité β -galactosidase caractéristique d'une interaction protéine-protéine dans ce système (Yeast Protocols Handbook, Clontech). Pour tous les clones positifs, on réalise une extraction des ADN plasmidiques en utilisant le kit NucleoSpin[®] Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel) et des billes de verre (Sigma) pour faciliter la lyse des levures. Les plasmides isolés ont été utilisés pour transformer des bactéries compétentes DH5 α (Invitrogen) qui ont été sélectionnées sur un milieu de culture contenant de l'ampicilline afin d'éliminer les clones faux positifs. Les plasmides contenus dans les clones positifs ont été extraits en utilisant le kit NucleoSpin[®] Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel) et ont été digérés par des enzymes de restriction EcoRV et Hind III afin d'obtenir un profil de digestion pour chaque clone. Les clones présentant des profils de digestion différents ont été séquencés (Eurofins MGW Operon). Ces séquences ont été analysées par BLAST sur la banque de données NCBI (<http://blastp.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/Blast.cgi>).

Clonage moléculaire de SmANP32

Dans le but de vérifier et de compléter la séquence prédite de SmANP32 dans le génome de *S. mansoni*, les extrémités 5' et 3' de l'ARNm de SmANP32 ont été déterminées par RACE PCR à partir d'ADNc de vers adultes en utilisant le kit GeneRacer (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. L'intégrité de la séquence codante complète a été vérifiée par PCR en utilisant la Taq polymérase Advantage 2 (Clontech) et les amorces SmANP32FLF/SmANP32FLR (Tableau 1). Le produit de PCR a été purifié à partir d'un gel d'agarose en utilisant le kit Wizard SVGel and PCR clean up system (Promega) et sous cloné dans un vecteur pCR2.1-TOPO (Invitrogen). La séquence a été vérifiée par séquençage (Eurofins MGW Operon). La séquence codante de SmANP32 a ensuite été amplifiée par PCR en utilisant les amorces SmANP32pGADF/SmANP32pGADR (Tableau 1) puis insérée entre les sites de restriction EcoRI et XhoI d'un vecteur pGADT7 DNA-AD (Clontech) qui code pour une étiquette HA en position N-terminale. L'analyse de la séquence protéique de SmANP32 a été effectuée en utilisant le programme ScanProsite [Hulo *et al.*, 2008] et en interrogeant la base de données Pfam [Finn *et al.*, 2008]. La localisation sub-cellulaire de la protéine a été prédite à l'aide du programme PSORT II [<http://psort.hgc.jp/>].

Synthèse *in vitro* d'ARNc

A partir des construits SmSirt1-pGBKT7 et SmANP32-pGADT7, nous avons produit *in vitro* des ARNm, qui présentent une coiffe en 5' essentielle à leur traduction dans l'ovocyte de xénope (ARNc). La séquence de SmSirt1 a été linéarisée en utilisant l'enzyme de restriction PmeI et celle de SmANP32 en utilisant Hind III. Les ARNc ont été synthétisés à l'aide du kit T7-mMessage mMACHINE[®] High Yield Capped RNA Transcription (Ambion[®]) puis précipités par une solution de chlorure de lithium (LiCl) à 2,5M. Les culots sont lavés dans de l'éthanol 70%, séchés, puis repris dans 20 µl d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate. La quantité d'ADN est déterminée par spectrophotométrie. Pour finir, 1 µg d'ARNc est analysé sur un gel d'agarose dénaturant afin de confirmer leur qualité et leur taille.

Expression en ovocyte de xénope

Les ovocytes de *Xenopus laevis* sont prélevés chirurgicalement après anesthésie des xénopes femelles et placés un milieu ND96 (96mM NaCl, 2mM KCl, 1,8mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, Hepes 5mM, ajusté à pH 7,4) contenant de la pénicilline (50µg/ml), de la streptomycine (50µg/ml), du pyruvate de sodium (225µg/ml) et un l'inhibiteur de trypsine (30µg/ml). Les ovocytes de stade VI sont ensuite traités à la collagénase A (1 µg/mL) pendant 1 heure, puis les cellules folliculaires sont retirées manuellement. Les ovocytes ainsi défolliculés sont conservés dans du milieu ND96 à 19°C. Ensuite, 60 nL d'ARNc (1 mg/mL) sont injectés dans chaque ovocyte (20 ovocytes) au niveau équatorial, à l'aide d'un nano injecteur, puis les ovocytes sont incubés 18 heures à 19°C dans du milieu ND96. Afin de contrôler l'état physiologique des ovocytes, on vérifie que ces derniers subissent la GVBD (Germinal Vesicle BreakDown), observable par l'apparition d'une tâche blanche au pôle animal des ovocytes. La GVBD est induite en réponse à la progestérone (2 µg/mL de ND96), et indique la maturation des ovocytes.

Co-immunoprécipitation et analyse par Western Blot

Après 24 heures d'expression, les ovocytes contenant les protéines SmSirt1 et SmANP32 sont broyés dans du tampon PY (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% aprotinine, 1 mM PMSF, 1 µM leupeptine, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM β-glycérophosphate) puis centrifugés à 10 000 g durant 15mn à 4°C. Pour réaliser la co-immunoprécipitation, le surnageant est incubé avec des anticorps anti-myc ou anti-HA (1/100^e, Invitrogen) pendant 1 heure à 4°C. Puis, des billes d'agarose couplées à la protéine A (Sigma) sont ajoutées pendant 1 heure à 4°C. Les complexes sont récupérés par centrifugation, rincés 3 fois puis repris dans du tampon de Laemmli, chauffés à 100°C pendant 10-15min puis déposés sur un

gel SDS-PAGE 10%. L'analyse des complexes protéiques est réalisée par Western Blot en utilisant des anticorps anti-HA ou anti-myc (1/50000^e) et le système de détection advanced ECL (Amersham Buisciences).

Mutagenèse dirigée

Un mutant catalytique inactif (SmSirt1GN) de SmSirt1 a été obtenu par mutagenèse dirigée en substituant des résidus alanines aux résidus glycine 162 et asparagine 247 [Khan et Lewis, 2006]. Les mutations ont été effectuées à partir du construit SmSirt1-pGBKT7 en utilisant les amorces SmSirt1G162AF/SmSirt1G162AR et SmSirt1N247AF/SmSirt1N247AR (Tableau 1) ainsi que la Taq polymérase Isis (MP biomedical) selon les recommandations du fournisseur. Les produits de PCR ont ensuite été traités avec l'enzyme DpnI (1U) pendant 1 heure à 37°C. Pour finir, les plasmides contenant la séquence mutée de SmSirt1 ont été amplifiés dans des bactéries compétentes DH5 α (Invitrogen) puis séquencés (Eurofins MGW Operon).

Mesure de l'activité de SmSirt1 en ovocyte de xénope

Les ARNc de SmSirt1 et de son mutant SmSirt1GN, catalytique inactif, ont été injectés dans des ovocytes de *X. laevis* comme décrit précédemment. La maturation des ovocytes a été déclenchée par l'ajout de progestérone (2 μ g/mL) dans le milieu de culture, deux heures après l'injection des ARNc. La maturation de chaque ovocyte (10 ovocytes), caractérisée par l'apparition d'une tâche blanche au pôle animal, a été déterminée visuellement toutes les deux heures pendant 15 heures. D'un point de vue moléculaire, la GVBD est caractérisée par une phosphorylation des MAPK (Erk1/2) et de l'histone H3. Ainsi, après 6 heures d'expression, une partie des ovocytes est lysée afin d'analyser par Western Blot l'expression de SmSirt1 ou de son mutant SmSirt1GN. La maturation des ovocytes sera déterminée par Western Blot en utilisant des anticorps anti-MAPK (Erk1/2) et anti-H3 phosphorylés (Invitrogen).

Afin d'étudier l'inhibition de l'activité catalytique de SmSirt1, les ovocytes injectés comme précédemment décrit ont été incubés dans du milieu de culture contenant 1, 5 et 20 μ M de sirtinol ou de salermide.

Oligonucléotides

Oligonucléotides	Utilisation	Sequences (5'→3')
SmSirt1FDH	5' transcrit Full length	GGTACCGAGCTCGGACTCGAGGACACCAAGAAGG
SmSirt1RDH	3' transcrit Full length	CCTCTACACTCGAGCGGATCCTTAGGTGGAGTCC
SmANP32FLF	5' transcrit Full length	GTTTCATTGTTTCGAATTATGACGT
SmANP32FLR	3' transcrit Full length	CATAGTTCATTCCGGGTGAATTTG
SmANP32pGADF	5' transcrit Full length	CGCCCTTGTTTCATTGTTTCGAGAATTCACGTACATG
SmANP32pGADR	3' transcrit Full length	GTTTATATCCTCGAGCTAATCATCAGCAGTTGATCC
SmSirt1G162AF	Mutagenèse	CCTCGTAATCACTGCTGCTGGTATTTTCAGTGTC
SmSirt1G162AR	Mutagenèse	GACACTGAAATACCAGCAGCAGTGATTACGAGG
SmSirt1N247AF	Mutagenèse	GCAACTACACCCAGGCCATCGACACCCTGGAG
SmSirt1N247AR	Mutagenèse	CTCCAGGGTGTGCGATGGCCTGGGTGTAGTTGC

Tableau 1: Liste des oligonucléotides utilisés

III Résultats

Identification de partenaires protéiques de SmSirt1

Dans le but d'identifier des partenaires protéiques de SmSirt1, nous avons réalisé le criblage d'une banque d'ADNc de vers adultes de schistosome en utilisant la technique du double hybride en levure. Pour ce faire, la séquence codante de SmSirt1 a été clonée dans un vecteur d'expression pGBKT7 en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4 (Gal4 DNA Binding Domain, Gal4 DBD). Les différents ADNc, contenus dans la banque ont été clonés par recombinaison homologue dans un vecteur pGADT7 en fusion avec le domaine d'activation de la transcription de Gal4 (Gal4 Activation Domain, Gal4 AD) codé par le vecteur pGBKT7. Les deux souches de levures ont ensuite été fusionnées et les diploïdes obtenus ont été étalés sur un milieu sélectif dépourvu en acides aminés tryptophane, leucine, histidine ainsi qu'en la base nucléique adénine. Si une interaction protéine-protéine a lieu entre SmSirt1 et une protéine de la banque, les deux parties du facteur de transcription sont assez proches pour activer la transcription de gènes indispensables à la croissance des levures sur ce milieu sélectif.

A la suite de la fusion des levures, nous avons pu sélectionner 2560 clones capables de se développer sur un milieu sélectif. L'ensemble de ces clones a subi un test d'activité pour la β -galactosidase afin d'éliminer les faux positifs. Ce test nous a permis de sélectionner 1073 clones positifs. Ensuite, nous avons extrait l'ADN plasmidique de 524 clones puis transformé des bactéries compétentes pour amplifier ces plasmides. Les bactéries transformées ont été étalées sur un milieu contenant de l'ampicilline afin de sélectionner uniquement les plasmides pGADT7 qui contiennent les séquences des partenaires de la banque et qui

portent un gène de résistance pour cet antibiotique. Les plasmides isolés ont ensuite été digérés par les enzymes de restriction Eco RV et Hind III afin d'établir le profil de digestion de chaque clone. A la suite de l'analyse sur gel des profils de digestion, seuls les clones qui présentent un profil différent ont été séquencés. Cette stratégie de criblage nous a permis d'identifier 25 protéines différentes capables d'interagir avec SmSirt1 (Tableau 2). Une analyse préliminaire des séquences obtenues par BLAST sur les banques de données NCBI, nous a permis d'identifier ces protéines lorsque des homologues existent chez d'autres espèces. Ces protéines ont été classées suivant leurs fonctions biologiques potentielles et regroupées dans le tableau 2.

General Function	Protein name	Accession number SchistoDB	Accession number
Extracellular matrix/cytoskeleton	Collagen alpha-1(V)	Smp_144910	XM_75487
	Actin-1	Smp_046600	XM_75933
Mitochondrial proteins	Cytochrome c oxidase subunit 1	n.d	AF_130787
	Sirtuin 5	Smp_055090	XM_76735
	Mitochondrial carrier protein	n.d	XM_71327
	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing protein 10 mitochondrial	Smp_007300	XM_72167
	Cytochrome b	Smp_190460	XM_69423
	NADH dehydrogenase subunit 5	n.d	AF_085145
	NADH dehydrogenase 6	Smp_171900	XM_80079
Transcription/DNA	Succinate dehydrogenase	Smp_061230	XM_77348
	PHD finger protein	Smp_153880	XM_77142
	Cohesin (rad21)	Smp_148150	XM_76124
	ANP32	Smp_010940	XM_72505
	Cellular nucleic acid binding protein/UMSBP	Smp_179300	XM_81028
RNA splicing/binding	Zinc finger protein 598 (<i>C. sinensis</i>)	Smp_173890	XM_80320
	snRNPula	Smp_069870	XM_78151
	RNA binding protein EWS	Smp_000240	XM_71438
Translation	tRNA splicing endonuclease Sen54	Smp_123690	XM_71712
	Eukaryotic translation initiation factor 4b/4h	Smp_079490	XM_79030
Protein chaperone translocation degradation	Nascent polypeptide associated complex alpha subunit	Smp_018530	XM_73248
	DNAj homolog subfamily B	Smp_132870	XM_73357
	Sec61 protein translocation complex beta subunit	Smp_019060	XM_73309
	E2-ubiquitin conjugating enzyme	Smp_103710	XM_81129
	Cathepsin B-like peptidase	Smp_067060	XM_69679

Tableau 2: Récapitulatif des protéines partenaires de SmSirt1 identifiées par criblage d'une banque d'ADNc de schistosomes adultes par la technique du double hybride en levure. Les protéines ont été classées en 6 groupes suivant leurs fonctions biologiques.

Parmi les protéines identifiées comme des partenaires directs de SmSirt1, on retrouve des protéines associées au cytosquelette ou à la matrice extracellulaire, des protéines mitochondriales ainsi que des protéines chaperonnes. Nous avons également identifié plusieurs protéines impliquées dans la transcription de l'ADN, dans l'épissage des ARN(s) ainsi que dans la traduction des protéines. D'autres sont des protéines qui jouent un rôle dans la translocation ou la dégradation des protéines. Dans la suite de ce travail, nous avons décidé d'étudier plus spécifiquement l'interaction entre SmSirt1 et SmANP32. Notre intérêt s'est porté sur cette protéine car plusieurs études suggèrent que la protéine ANP32 est impliquée dans la régulation de la transcription des gènes soit en inhibant des complexes protéiques qui possèdent une activité acétyltransférase [Kutney *et al.*, 2004 ; Tochio *et al.*, 2010] soit en agissant directement sur des facteurs de transcription [Cvetanovic *et al.*, 2007 ; Loven *et al.*, 2004]. De plus, chez le schistosome un des membres de la famille des protéines ANP32, SmLANP, a déjà été caractérisé [Pinheiro *et al.*, 2009].

D'un point de vue expérimental, nous avons dans un premier temps déterminé la séquence codante entière de SmANP32 par RACE PCR. Ainsi, nous avons déterminé que la taille de la séquence entière de SmANP32 est de 897 bp et qu'elle code pour une protéine de 299 acides aminés avec un poids moléculaire égal à 32 KDa. Une analyse de la séquence protéique a permis de mettre en évidence la présence de 6 domaines LRR en position 21-42, 44-65, 66-88, 89-110, 114-135 ainsi que celle d'un domaine riche en résidus asparagine dans la région C-terminale de la protéine. De plus, une analyse de cette même séquence avec le programme PSORT II, prédit une localisation nucléaire de SmANP32. Dans différents organismes, on retrouve plusieurs isoformes d'ANP32 [Matilla et Radrizzani, 2005] et l'alignement de leur séquence, nous a permis de montrer que nous avons cloné l'isoforme ANP32A. De plus, l'alignement de cette isoforme avec SmLANP nous a permis de montrer que ces deux protéines présentent 93% d'identité.

Dans un second temps, afin de démontrer la spécificité de l'interaction entre SmSirt1 et SmANP32, nous avons procédé à une co-immunoprécipitation des deux protéines dans un modèle hétérologue utilisé au laboratoire pour exprimer les protéines de schistosome: l'ovocyte de xénope. Pour ce faire, les ARNm de SmSirt1 fusionnés avec une étiquette myc ainsi que ceux de SmANP32 fusionnés avec une étiquette HA ont été micro-injectés dans des ovocytes de xénope. Après 18 heures d'expression, les protéines ont été immunoprécipitées avec des anticorps anti-myc ou anti-HA et les complexes protéiques ont été analysés par Western Blot en effectuant des révélations croisées. Les résultats obtenus montrent que les protéines SmSirt1 et SmANP32 sont exprimées dans les ovocytes de xénope et la co-immunoprécipitation indique que SmSirt1 interagit avec SmANP32 (Fig 2).

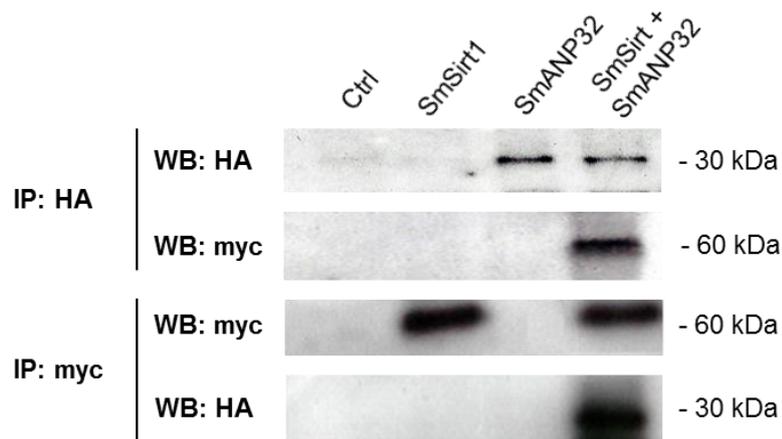


Figure 2: Confirmation de l'interaction entre les protéines SmSirt1 et SmANP32 par co-immunoprécipitation en ovocytes de xénope. Les ARNm de SmSirt1 et SmANP32 sont injectés seuls ou co-injectés dans des ovocytes de xénope. Après la lyse des ovocytes, les protéines sont immunoprécipitées avec des anticorps anti-myc et anti-HA puis révélées par Western Blot en effectuant des révélations croisées. La protéine SmSirt1 est en fusion avec une étiquette myc alors que la protéine SmANP32 est en fusion avec une étiquette HA.

Mise au point d'un dosage de l'activité enzymatique de SmSirt1 dans des ovocytes de xénopes

Dans la suite de cette partie, nous allons nous intéresser aux résultats obtenus concernant l'étude de l'inhibition de l'activité catalytique de SmSirt1 par des inhibiteurs de sirtuines humaines dans des ovocytes de xénope. Pour ce faire, nous avons injecté dans des ovocytes de xénope des ARNm de SmSirt1 et de son mutant catalytique inactif SmSirt1GN. Après deux heures d'expression, la maturation des œufs a été déclenchée par l'ajout de progestérone (PG) dans le milieu de culture. Ensuite, nous avons réalisé une étude cinétique de la maturation des œufs et comparé l'évolution de la GVBD dans le temps entre des ovocytes injectés avec des ARNm de SmSirt1 et des ovocytes contrôles injectés avec des ARNm de SmSirt1GN ou non injectés. Les résultats obtenus montrent que SmSirt1 entraîne un retard de la maturation des ovocytes comparativement aux ovocytes contrôles injectés avec le mutant SmSirt1GN ou non injectés (Fig 3A). En effet, il faut 14 heures pour obtenir 90 % d'ovocytes matures lorsqu'ils expriment SmSirt1 alors que seulement 8 heures sont nécessaires pour obtenir 90 % d'ovocytes matures lorsqu'ils expriment le mutant catalytique SmSirt1GN. Les ovocytes contrôles, qui n'ont pas été injectés, ont tous maturés, 8 heures après l'ajout de progestérone (PG) dans le milieu. Afin de contrôler l'expression des protéines et de confirmer la maturation des ovocytes au cours de la cinétique, nous avons analysé, par Western Blot, des lysats ovocytaires 6 heures après l'ajout de progestérone dans le milieu. Cette analyse démontre qu'après 8 heures d'expression, les protéines SmSirt1 et SmSirt1GN sont exprimées dans les ovocytes (Fig 3B). De plus, la

phosphorylation des MAPK (Erk1/2) et de l'histone H3 nous permettent de dire que, 6 heures après l'ajout de progestérone, la GVBD n'est pas induite en présence de la protéine SmSirt1 alors qu'en présence de son mutant catalytique SmSirt1GN, la maturation des ovocytes est induite. Dans les ovocytes contrôles, nous avons également mis en évidence la phosphorylation des MAPK (Erk1/2) et de l'histone H3 (Fig 3 B).

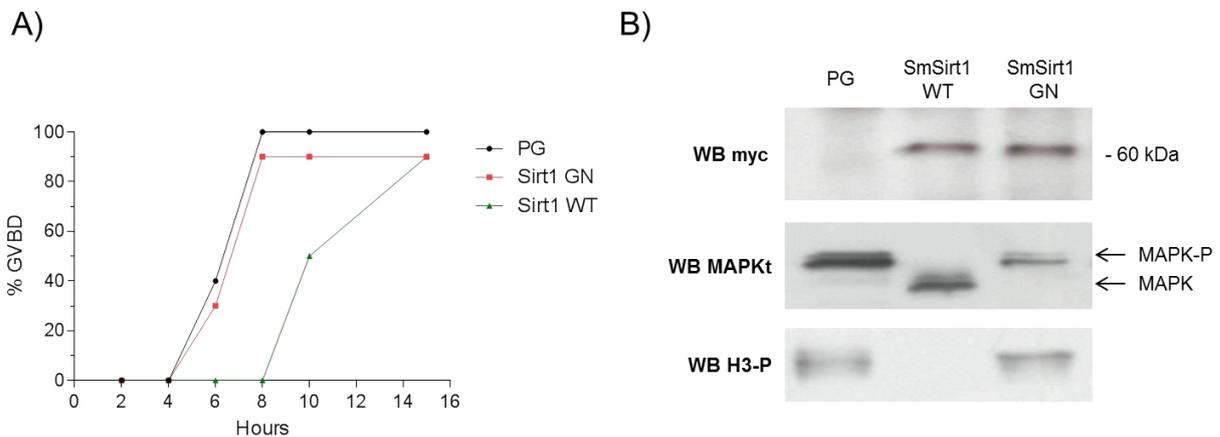


Figure 3: SmSirt1 induit un retard de la maturation des ovocytes de xénope. (A) Représentation graphique de l'évolution au cours du temps de la maturation des ovocytes exprimant SmSirt1 (vert), SmSirt1GN (rouge) et des ovocytes contrôles (noir). 2 heures après l'injection des ARNm, la maturation des œufs a été déclenchée par l'ajout de progestérone (t=0). (B) Western Blot des lysats ovocytaires, 6 heures après l'ajout de progestérone dans le milieu. La phosphorylation des MAPK et de l'histone H3 est caractéristique de la maturation des ovocytes.

Etude de l'inhibition de SmSirt1 par la salermide et le sirtinol

Ces résultats préliminaires nous ont permis d'envisager d'étudier l'inhibition de l'activité enzymatique de SmSirt1 par des inhibiteurs de sirtuines humaines tels que le sirtinol et la salermide. Pour ce faire, des ovocytes exprimant SmSirt1 et SmSirt1GN ont été incubés dans un milieu de culture contenant du sirtinol ou de la salermide à des concentrations égales à 1, 5 et 20 μ M. Ainsi, nous avons pu montrer que le sirtinol et la salermide à 20 μ M affectent l'activité enzymatique de SmSirt1 dans notre modèle d'étude (Fig 4). En effet, ces deux inhibiteurs à 20 μ M, permettent de diminuer le retard de maturation des ovocytes induit par l'expression de SmSirt1. Les résultats obtenus montrent qu'en présence de 20 μ M de sirtinol et de salermide, il faut 10 heures pour que tous les ovocytes exprimant SmSirt1 soient matures alors que 14 heures sont nécessaires pour obtenir 90 % d'ovocytes matures en l'absence d'inhibiteur (Fig 4B et 4D). Cependant, aucun effet inhibiteur sur SmSirt1 n'a été observé pour des concentrations en inhibiteurs égales à 1 et 5 μ M. De plus, dans des ovocytes contrôles exprimant le mutant SmSirt1GN, nous avons démontré que ces deux inhibiteurs n'affectent pas la maturation des ovocytes au cours du temps (Fig 4A et 4C).

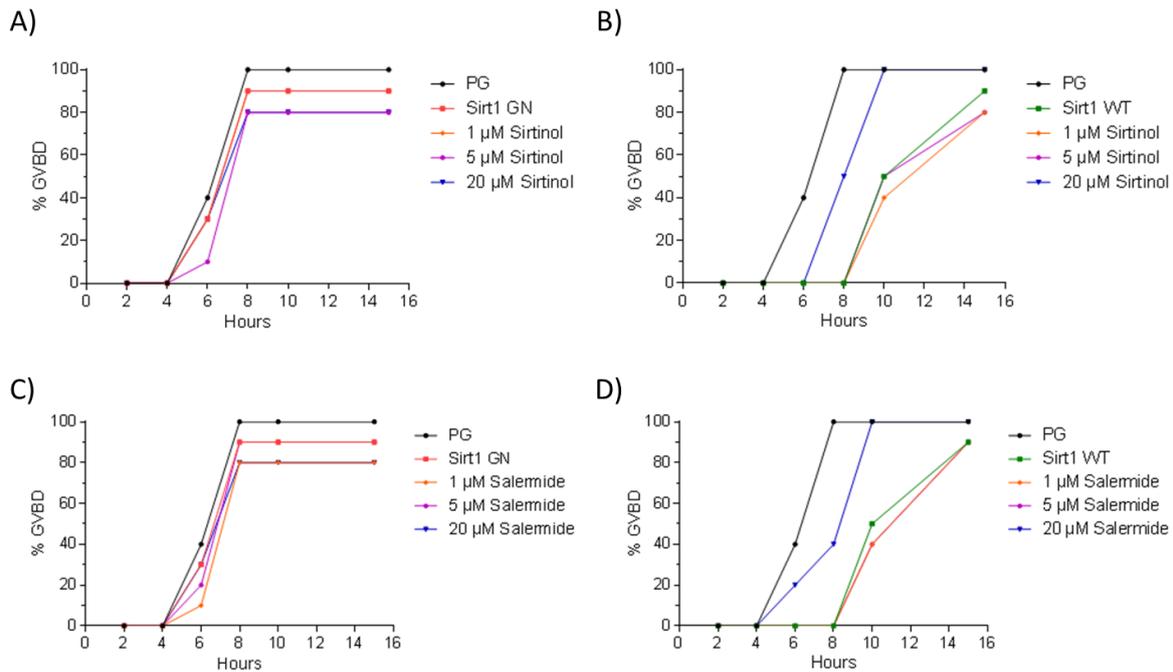


Figure 4: Le sirtinol et la salemide affectent l'activité enzymatique de SmSirt1 dans des ovocytes de xénope. Représentation graphique de l'évolution de la maturation au cours du temps d'ovocytes exprimant SmSirt1 (vert), SmSirt1GN (rouge) et d'ovocytes contrôles (noir). Des ovocytes exprimant SmSirt1 ont été incubés avec le sirtinol (B) et la salemide (D) à des concentrations égales à 1 μ M (orange), 5 μ M (violet) et 20 μ M (bleu). Des ovocytes contrôles, exprimant SmSirt1GN ont été incubés avec le sirtinol (A) et la salemide (C) à des concentrations égales à 1 μ M (orange), 5 μ M (violet) et 20 μ M (bleu). 2 heures après l'injection des ARNm, la maturation des œufs a été déclenchée par l'ajout de progestérone (t=0).

IV Discussion

Dans ce travail, nous avons envisagé d'identifier des partenaires protéiques de SmSirt1 afin d'étudier plus précisément sa fonction biologique chez *S. mansoni*. Le criblage d'une banque d'ADNc de vers adultes par la technique du double hybride en levure, nous a permis de mettre en évidence 25 protéines capables d'interagir avec SmSirt1. Ces partenaires protéiques ont été classés en fonction de leurs rôles biologiques potentiels. Parmi ces protéines, notre intérêt s'est porté sur SmANP32. Chez l'homme, 9 membres appartenant à la famille ANP32 ont été caractérisés (ANP32A, B1, B2, C, D, E, F, G et H). Il a été montré que l'ANP32A est impliqué dans de nombreux processus cellulaires comme la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire. De plus, cette protéine est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes en se fixant aux histones et en entraînant par ce biais une inhibition de leur acétylation par les coactivateurs de la transcription p300/CBP et PCAF. Cependant, le mécanisme précis par lequel ANP32A participe à ce processus biologique reste encore à élucider. La protéine ANP32B interagit avec l'ARN polymérase I et serait ainsi impliquée dans la biosynthèse des ARN ribosomiaux.

Par ailleurs, il a été démontré que ANP32B interagit également avec des facteurs nucléaires impliqués dans la réplication de l'ADN et qu'elle participe au cycle cellulaire au niveau de la transition entre les phases G1 et S. A l'inverse d'ANP32A, considérée comme un suppresseur de tumeur, ANP32C et D favorisent le développement de tumeurs dans des modèles murins. Pour finir, la protéine ANP32E est impliquée dans le développement neuronal. A ce jour, les rôles biologiques d'ANP32F, G et H sont encore inconnus.

L'analyse de la séquence protéique de SmANP32 ainsi que la réalisation d'alignements avec les différentes isoformes de plusieurs espèces, nous a permis de montrer que la séquence clonée présente de fortes homologues avec ANP32A. Il est intéressant de noter que la séquence de SmLANP, décrite par Pinheiro *et al.* [Pinheiro *et al.*, 2009], présente une délétion de 63 nucléotides par rapport à la séquence que nous avons caractérisée par RACE PCR. A partir d'une analyse du génome, nous avons observé que cette délétion ne pouvait pas être générée par épissage alternatif. En effet, celle-ci est présente au sein d'un exon et aucun site consensus d'épissage n'est retrouvé à ses extrémités. Ainsi, nous pensons que la séquence caractérisée par Pinheiro *et al.* serait un artefact de clonage.

Par la suite, nous avons confirmé l'interaction de SmANP32 avec SmSirt1 par co-immunoprécipitation en ovocyte de xénope, un modèle hétérologue utilisé au laboratoire pour exprimer les protéines de schistosome. A la suite de ce travail, nous envisageons de caractériser plus précisément cette interaction en identifiant les régions impliquées dans la fixation de SmSirt1 et SmANP32. L'analyse de la séquence de SmANP32 nous a permis d'identifier 5 domaines LRR en région N-terminale. Ces domaines sont composés de 20 à 30 acides aminés, enrichis en résidus leucine et sont généralement répétés pour former une structure en forme de fer à cheval [Enkhbayar *et al.*, 2004] impliquée dans la formation des interactions protéine-protéine [Kobe et Kajava, 2001]. Ainsi, nous supposons que les domaines LRR présents dans SmANP32 sont responsables de son interaction avec SmSirt1. En parallèle, nous envisageons d'identifier la région de SmSirt1 responsable de son interaction avec SmANP32. Dans le but de « disséquer » cette interaction, nous réaliserons différents construits de SmSirt1 dans lesquels certaines régions de la protéine seront supprimées. Les peptides correspondants seront exprimés avec SmANP32 dans des ovocytes de xénope puis co-immunoprécipités afin d'identifier la région de SmSirt1 impliquée dans l'interaction. De même, nous réaliserons différents construits de SmANP32 dans lesquels les domaines LRR seront supprimés. L'expression des peptides correspondants en ovocyte de xénope sera vérifiée puis ils seront co-immunoprécipités avec la région de SmSirt1 précédemment identifiée. L'ensemble des résultats obtenus nous permettra d'identifier les régions de SmSirt1 et de SmANP32 responsables de leur interaction. Dans le but d'étudier le rôle biologique de cette interaction chez le schistosome, nous proposons de

réaliser des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) Dans un premier temps, l'immunoprécipitation de la chromatine successive avec des anticorps dirigés contre SmSirt1 puis SmANP32 (Re-ChIP) permettra d'affirmer la présence des deux protéines dans les mêmes complexes. Ces immunoprécipitations seront suivies d'un séquençage des fragments d'ADN fixés par les complexes contenant SmSirt1 et SmANP32 (ChIPSeq) afin d'identifier les gènes cibles dont l'expression serait modulée par l'interaction entre ces deux protéines. En parallèle, la co-immunoprécipitation dans des extraits cellulaires des complexes contenant les deux protéines sera suivie d'une analyse par spectrométrie de masse pour mettre en évidence d'autres protéines présentes dans ces complexes. Pour finir, nous souhaitons réaliser l'inactivation de l'expression du transcrit de SmANP32 par ARNi afin d'étudier son rôle dans la survie et la reproduction de *S. mansoni*.

Par ailleurs, au cours de ce projet de recherche, nous avons envisagé d'étudier le rôle biologique de SmSirt1 et SmSirt2 dans la survie et la reproduction de *S. mansoni*. Ainsi, nous avons montré *in vitro*, que des inhibiteurs de sirtuines humaines induisent la mort de schistosomules et affectent la stabilité de l'appariement et la production d'œufs des vers adultes. L'obtention de la protéine SmSirt2 recombinante nous a permis de mettre au point un dosage fluorimétrique afin d'étudier son activité enzymatique et son inhibition par des inhibiteurs génériques de sirtuines humaines. Cependant, malgré des efforts conséquents, l'optimisation de l'expression de SmSirt1 recombinante n'a pas permis d'obtenir une protéine soluble et d'étudier son inhibition *in vitro* par des inhibiteurs de sirtuines humaines. Néanmoins, pour faire face à ce problème, nous avons mis au point l'expression de SmSirt1 dans des ovocytes de xénope afin de pouvoir étudier son inhibition. Ainsi, nous avons montré que le sirtinol et la salermide, deux inhibiteurs de Sirt1 et Sirt2 humaines, sont également capables d'affecter l'activité enzymatique de SmSirt1. Ces résultats mis en corrélation avec ceux obtenus à la suite de l'inactivation du transcrit de SmSirt1 et du traitement de parasite avec du sirtinol et de la salermide (voir partie 1 des résultats), nous permettent d'affirmer que l'inhibition de SmSirt1 affecte *in vitro* la viabilité des schistosomules, la morphologie des organes reproducteurs ainsi que la production des œufs des vers adultes de schistosome. Bien que ce dosage ne se prête pas à un criblage d'inhibiteurs à haut débit, il pourrait nous servir à l'avenir à déterminer la sélectivité d'inhibiteurs développés contre SmSirt2. En effet, l'objectif de notre approche est d'obtenir des inhibiteurs sélectifs de nos enzymes cibles afin de limiter l'apparition d'effets secondaires.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES

L'épigénétique et les sirtuines comme cibles thérapeutiques

Toutes les cellules d'un organisme possèdent un patrimoine génétique identique. Pourtant, celles-ci ne développent pas les mêmes caractéristiques. Dans chaque cellule, l'expression des gènes est différente et est soumise à une régulation particulière dite épigénétique. Développée récemment, cette notion propose d'étudier le rôle fondamental de l'environnement sur l'expression des gènes. A ce jour, plusieurs mécanismes épigénétiques impliqués dans la modification de la structure de la chromatine ont été mis en évidence. Ces mécanismes affectent l'expression des gènes sans modifier la séquence d'ADN et sont transmissibles d'une cellule mère à ses cellules filles. Chez l'homme, l'ensemble de ces mécanismes régulent de nombreux processus cellulaires et leurs dysfonctionnements sont associés à de nombreuses pathologies. Ainsi, il a été mis en évidence des aberrations épigénétiques dans les cancers, le diabète, l'asthme et dans certaines maladies auto-immunes et neurologiques [Kelly *et al.*, 2010]. Au laboratoire, depuis plusieurs années, notre équipe s'intéresse aux modifications post-traductionnelles des histones et plus particulièrement au rôle de la balance acétylation/désacétylation dans la régulation de l'expression des gènes chez *S. mansoni*. L'ensemble des travaux que nous avons menés avait pour but d'identifier les enzymes impliquées dans ces processus afin d'étudier leur rôle potentiel en tant que cibles thérapeutiques. Nos recherches se sont focalisées sur ces enzymes car celles-ci sont déjà ciblées dans le cas de plusieurs pathologies humaines et notamment le cancer.

Chez l'homme, les cellules cancéreuses sont caractérisées par une surexpression des HDAC(s) de classe I et II qui entraîne une réduction globale du niveau d'acétylation des histones. En effet, on observe une surexpression de HDAC1 dans les cancers de la prostate, du colon, du sein et de l'intestin, de HDAC2 dans les cancers colorectaux, cervicaux et intestinaux. L'expression de HDAC3 a été mise en évidence dans des tumeurs du colon et celle de HDAC6 dans des tumeurs du sein [Bolden *et al.*, 2006]. L'utilisation de SiRNA pour diminuer la surexpression de chaque HDAC(s) dans certaines lignées cellulaires cancéreuses induit une diminution de la croissance et de la survie de ces cellules. De plus, dans les cellules cancéreuses, il a été mis en évidence une diminution de l'acétylation de H4K16 et de la trimétylation de H4K20 [Fraga *et al.*, 2005]. Cette diminution du niveau d'acétylation est la première étape observée dans le mécanisme de la répression de l'expression des gènes. Les HDAC(s), qui sont responsables de la suppression d'un groupement acétylé sur les histones mais aussi sur de nombreuses protéines cellulaires, sont ainsi devenues des cibles thérapeutiques prometteuses dans le traitement des cancers.

Les sirtuines sont également impliquées dans le développement de cancers et différents rôles ont été proposés pour Sirt1, Sirt2, Sirt3, Sirt6 et Sirt7. Dans des modèles génétiques de souris, il a été montré que Sirt1, Sirt2, Sirt3 et Sirt6 sont des suppresseurs de tumeurs [Bruzzone *et al.*, 2013]. Dans le cas de Sirt1, cette activité est due à la désacétylation et à l'inhibition d'une sous-unité de NF- κ B, un facteur de transcription qui présente une activité anti-apoptotique et pro-inflammatoire [Yeung *et al.*, 2004]. De plus, dans le cancer du colon, il a été montré que Sirt1 désacétyle la β -caténine et entraîne une suppression de sa capacité à activer la transcription et la prolifération cellulaire [Firestein *et al.*, 2008]. Par ailleurs, il a été montré chez la souris que Sirt2 est un suppresseur de tumeur en participant à la régulation de la mitose et à l'intégrité du génome. De plus, dans des cellules cancéreuses du sein et du foie, il a été montré que l'expression de Sirt2 est diminuée par rapport à des cellules saines. Il a également été proposé que le rôle de Sirt3 dans le métabolisme mitochondrial, la production d'espèces réactives de l'oxygène et la stabilité du génome, s'oppose au développement de cancers [Kim *et al.*, 2010 ; Finley *et al.*, 2011]. Sirt6 semble également être un suppresseur de tumeurs car sa surexpression dans des lignées cellulaires cancéreuses permet d'induire l'apoptose [Van Meter *et al.*, 2011]. De plus, l'activité anti-cancéreuse de Sirt6 est due à sa capacité à réguler négativement NF- κ B et HIF-1 α entraînant une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la glycolyse et l'angiogenèse [Kawahara *et al.*, 2009 ; Zhong *et al.*, 2010]. Pour finir, il a été montré *in vivo* que la suppression de Sirt6 chez la souris entraîne le développement de cancers [Sebastián *et al.*, 2012].

Cependant, le rôle des sirtuines dans le développement du cancer semble compliqué à établir puisque ces mêmes sirtuines peuvent également favoriser la croissance de tumeurs et il semble que, dans certains cas, leur inhibition soit préférable à leur activation. Ainsi, plusieurs études ont démontré que Sirt1 est impliquée dans la tumorigénèse en désacétylant et inactivant p53 [Vaziri *et al.*, 2001] et des facteurs de transcription pro-apoptotique de la famille FoxO [Brunet *et al.*, 2004]. De plus, il a été montré que les inhibiteurs de Sirt1 présentent une activité anticancéreuse ou permettent de sensibiliser des cellules tumorales vis-à-vis d'agent anticancéreux ou d'un stress oxydatif. Par ailleurs, l'inhibition de Sirt2 induit des effets anticancéreux comme l'accumulation de p53, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose [Peck *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2009]. Dans certains types de cancers l'activité de Sirt3 semble favoriser le développement de tumeurs. Ainsi, une surexpression de Sirt3 a été mise en évidence dans des cellules de carcinomes oraux et la réduction de celle-ci par ARNi permet de diminuer la prolifération des cellules cancéreuses et augmente leur sensibilité aux radiations et au cisplatine [Alhazzazi *et al.*, 2011]. Les inhibiteurs de Sirt6 peuvent également être utilisés pour augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses à la

chimiothérapie et la radiothérapie [McCord *et al.*, 2009]. Pour finir, plus récemment, il a été montré que Sirt7 entraîne le développement de tumeurs en désacétylant H3K18 pour réprimer des gènes qui présentent une fonction de suppresseurs de tumeurs. De plus, la suppression de Sirt7 dans un modèle de souris greffées avec une tumeur humaine permet de réduire la tumorigénicité [Barber *et al.*, 2012].

L'implication et le rôle des HDAC(s) dans le développement des cancers ont stimulé la recherche d'inhibiteurs de ces enzymes. La plupart de ces inhibiteurs n'est pas sélectif d'une seule HDAC et entraîne généralement des effets secondaires. Néanmoins, il a été démontré dans des essais cliniques que des inhibiteurs sélectifs d'HDAC(s) présentent des effets bénéfiques dans certains cancers. Par exemple, l'utilisation d'un inhibiteur sélectif d'HDAC8 permet d'arrêter la prolifération et la différenciation des cellules de neuroblastome [Oehme *et al.*, 2009]. Plusieurs inhibiteurs d'HDAC(s) de seconde génération, plus sélectifs, sont actuellement étudiés dans des essais cliniques pour traiter différents types de cancers. A ce jour, 2 inhibiteurs d'HDAC(s) de classe I ont été approuvés par la FDA (US Food and Drug Administration) dans le traitement du lymphome des cellules T cutanées et 13 sont en phase d'essais cliniques pour le traitement de différents cancers [Arrowsmith *et al.*, 2012]. Cependant, il est intéressant de noter qu'un seul inhibiteur de sirtuine, sélectif de Sirt1, est entré en phase II d'essai clinique dans le traitement de la maladie de Huntington. Il semble donc que l'utilisation d'inhibiteurs de sirtuines soit délicate dans le traitement du cancer car, comme nous l'avons vu précédemment, ces enzymes présentent des fonctions très diverses et parfois opposées en fonction du type de cancer considéré. De plus, les composés développés sont bien souvent peu sélectifs d'une sirtuine particulière et entraînent des effets secondaires importants.

L'utilisation d'inhibiteurs d'HDAC(s) a également été proposée dans le traitement de certaines parasitoses. En effet, les parasites présentent au moins deux caractéristiques communes avec les cellules cancéreuses: une activité métabolique élevée et une division cellulaire intense. De plus, les parasites sont des organismes qui présentent différents stades de développement et un cycle de vie complexe dans lequel on retrouve généralement plusieurs hôtes. Pour se développer et résister à des conditions environnementales extrêmes, les parasites régulent au cours de leur vie, leur morphologie, l'expression de leurs gènes ainsi que leur cycle cellulaire. L'expression des gènes détermine l'état de différenciation des cellules et joue un rôle majeur dans la régulation de l'activité de chaque stade de développement du parasite dans différentes conditions physiologiques. Plusieurs études rapportent que l'utilisation d'inhibiteurs de sirtuines affecte le développement ou la viabilité de différents parasites. Par exemple, il a été montré que le sirtinol induit *in vitro* la mort d'amastigotes de *Leishmania infantum* [Vergnes *et al.*, 2005]. De plus, des amastigotes

LiSir2^{-/-} présentent une réduction de leur capacité à se multiplier *in vitro* dans des macrophages et *in vivo* dans des souris Balb/c [Vergnes, 2005]. Un autre inhibiteur de sirtuine, le nicotinamide présente également *in vitro* une activité antiparasitaire sur différentes espèces de *Leishmania* [Serenio *et al.*, 2005]. Chez *Plasmodium falciparum*, la surfactine inhibe PfSir2 et affecte le développement *in vitro* des stades parasitaires présents dans les érythrocytes [Chakrabarty *et al.*, 2008]. Pour finir, il a été montré que les sirtuines jouent un rôle important dans la biologie et la virulence de *Trypanosoma brucei* et *Trypanosoma cruzi* [Kaur *et al.*, 2012].

Au cours de mon projet de thèse, nos recherches se sont focalisées sur l'étude du rôle potentiel des sirtuines en tant que cibles thérapeutiques dans le traitement de la schistosomiase. Ainsi, le premier objectif de nos travaux a été de caractériser l'ensemble des sirtuines présentes chez *S. mansoni*. A partir d'une analyse *in silico* du génome de *S. mansoni*, nous avons mis en évidence cinq orthologues parmi les sept sirtuines retrouvées chez les mammifères: SmSirt1, 2, 5, 6 et 7. Il est intéressant de remarquer que les sept orthologues sont présents chez d'autres membres des lophotrochozoaires: l'oligochète *Capitella capitata* et le cnidaire *Nematostella vectensis*. La présence de l'ensemble de ces orthologues suggère qu'ils étaient également présents chez l'ancêtre commun des métazoaires ainsi que chez l'ancêtre de la lignée des lophotrochozoaires [Greiss et Gartner, 2009]. Ainsi, Il semble donc que les gènes codant les sirtuines Sirt3 et Sirt4 ont été perdus au cours de l'évolution des schistosomes. La perte de ces gènes semble être arrivée relativement tard dans l'évolution du schistosome car ces derniers sont présents chez le parasite trématode *Clonorchis sinensis*, un autre membre de la branche du groupe des Digènes [Cribb *et al.*, 2001]. Cependant chez ce parasite, le gène codant Sirt6 est absent. Cette observation suggère que les gènes codant les sept sirtuines retrouvés chez les mammifères étaient également présents chez l'ancêtre des Digènes et, par conséquent, chez les Plathelminthes. La conservation des domaines catalytiques des sirtuines pendant l'évolution des métazoaires rend peu probable la possibilité que les gènes codant Sirt3 et Sirt4 existent dans le génome de *S. mansoni* et que les séquences de ces deux gènes aient divergé au point où il n'est plus possible de les identifier par des méthodes standards. De plus, leur inactivation semble peu probable car aucun pseudogène correspondant n'a été détecté dans les génomes des schistosomes. Par conséquent, ces gènes ont donc été perdus au cours de l'évolution des Schistosomatidae. Pour finir, il serait possible de relier la perte de certains gènes codant des sirtuines au mode de vie parasitaire des schistosomes. En effet, l'absence de gènes codant Sirt4 et Sirt5 chez deux cestodes, *Echinococcus granulosus* et *Echinococcus multilocularis*, peut conforter l'hypothèse que les formes mitochondriales des sirtuines peuvent être plus facilement perdues que d'autres et que leurs

fonctions ont pu être reprises par l'une ou l'autre des sirtuines restantes. Chez *S. mansoni*, *SmSirt5* est le seul gène à générer des isoformes d'épissage alternatif et nous pouvons spéculer que ces isoformes remplissent des fonctions différentes dans la mitochondrie. Dans ce contexte, Il serait intéressant de déterminer si le gène codant Sirt3 chez *Echinococcus*, le seul codant pour une enzyme mitochondriale chez ces parasites, génère également des isoformes d'épissage alternatif. Toutefois, ces spéculations doivent être nuancées car les trois gènes codant des sirtuines mitochondriales sont absents chez le gastéropode *Lotia gigantea*, un lophotrochozoaire non-parasitaire et chez le moustique *Anopheles gambiae*, vecteur du paludisme [Greiss et Gartner, 2009].

Au cours de notre étude, les séquences codantes des sirtuines identifiées chez *S. mansoni* ont été caractérisées par RACE PCR et un alignement des domaines catalytiques de ces enzymes nous a permis de réaliser une étude phylogénétique. De plus, nous avons montré par PCR quantitative en temps réel que tous les transcrits identifiés sont exprimés à tous les stades de développement du parasite. Afin d'étudier le rôle potentiel de ces enzymes comme cibles thérapeutiques, nous avons, dans un premier temps, envisagé d'étudier l'effet d'inhibiteurs génériques de sirtuines humaines sur des parasites en culture. Pour ce faire, nous avons décidé d'utiliser le sirtinol, la salermide et le MS3 qui sont des inhibiteurs non sélectifs de Sirt1 et Sirt2 humaines. Ainsi, nous avons montré que ces composés induisent *in vitro* la mort de schistosomules. De plus, la mise en évidence de la fragmentation de l'ADN par la technique de TUNEL nous a permis de montrer que ces trois inhibiteurs de sirtuines induisent l'apoptose dans les cellules des schistosomules. D'un point de vue général, l'ensemble des inhibiteurs d'HME que nous avons testés au laboratoire sur des schistosomules maintenus en culture induisent l'apoptose des cellules du schistosome de manière dose-dépendante. Cependant, dans des cellules cancéreuses humaines tous les inhibiteurs d'HME n'induisent pas ce mécanisme de mort cellulaire programmée. Ces enzymes semblent donc essentielles à la biologie du parasite et une dérégulation de leurs activités entraîne *in vitro* une diminution de la viabilité des schistosomules.

L'effet de ces inhibiteurs de sirtuines humaines a également été étudié sur des vers adultes maintenus en culture. Au cours du traitement, deux paramètres ont été suivis: la stabilité de l'accouplement des vers et la production des œufs. Cette étude nous a permis de montrer que les inhibiteurs de sirtuines humaines affectent la stabilité de l'accouplement des vers adultes et diminuent la production des œufs de manière dose-dépendante en fonction de la durée du traitement. Dans le but de compléter ces résultats, à la suite du traitement, nous avons recherché l'apparition d'un phénotype au niveau des testicules et de l'ovaire de vers adultes par microscopie confocale. Ainsi nous avons montré que la salermide induit chez la femelle une désorganisation de l'ovaire avec une augmentation significative du nombre

d'ovocytes matures et, chez le mâle, une diminution drastique du nombre de spermatocytes. Les cellules germinales se multiplient activement et il semble que l'inhibition des sirtuines chez le schistosome perturbe la division cellulaire. Néanmoins, des expériences complémentaires seront nécessaires pour confirmer l'implication des sirtuines dans les processus d'ovogénèse et de spermatogénèse. En effet, nous avons constaté au laboratoire que l'apparition de phénotypes anormaux au niveau des organes reproducteurs des vers adultes est fréquemment observée après traitement des parasites avec des inhibiteurs générique d'HDAC(s) et de kinases humaines. Ainsi, nous supposons que les organes reproducteurs du schistosome sont particulièrement sensibles au dérèglement de la signalisation cellulaire et de la transcription car ils sont des lieux de métabolisme et de division cellulaire intense.

SmSirt2: Une cible thérapeutique ?

A la suite de ces travaux, nous avons étudié plus précisément le rôle de SmSirt2 en tant que cible thérapeutique. L'optimisation de l'expression de la protéine recombinante ainsi que celle d'un dosage fluorimétrique par nos collaborateurs impliqués dans le projet SETReND nous a permis d'étudier son activité enzymatique. De plus, nos collaborateurs de la société Kancera AB ont mis en place un criblage à haut débit d'une chimiothèque de plus de 2 millions de composés afin d'identifier des inhibiteurs de SmSirt2. La cytotoxicité des composés les plus prometteurs a été étudiée sur différentes lignées cellulaires cancéreuses et sur des fibroblastes humains. Les résultats obtenus montrent que les inhibiteurs de SmSirt2 que nous avons sélectionnés sont peu toxiques pour les cellules humaines que nous avons utilisées. Sur la base des études réalisées avec des inhibiteurs génériques de sirtuines humaines, nous avons évalué la toxicité des composés identifiés sur des parasites maintenus en culture. Ainsi, nous avons montré que les inhibiteurs de SmSirt2 affectent *in vitro*, la viabilité des schistosomules et la stabilité de l'accouplement des vers adultes. De plus, ces inhibiteurs induisent une diminution de la production des œufs au cours du traitement et des analyses par microscopie confocale ont permis de mettre en évidence l'apparition de phénotypes au niveau des organes reproducteurs des vers. Parmi ces inhibiteurs, le composé A entraîne également une altération du tégument des vers adultes. Cependant, nous pouvons nous interroger sur la sélectivité de ce composé car l'apparition de ce phénotype n'a jamais été observée auparavant sur des parasites traités avec des inhibiteurs de sirtuines, ni avec des inhibiteurs d'HDAC(s) de classes I et II. Ainsi, nous pensons que l'apparition de ce phénotype est due à un effet de ce composé sur une autre cible. Pour l'ensemble des composés testés, les phénotypes observés au niveau des organes reproducteurs sont néanmoins identiques à ceux obtenus après traitement des

parasites avec des inhibiteurs de sirtuines humaines et suggèrent que l'inhibition de SmSirt2 affecte la reproduction du schistosome. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons réalisé l'invalidation de l'expression de SmSirt2 par ARN interférence. Cependant les résultats préliminaires obtenus ne sont pas concluants et ne nous permettent pas de montrer une implication de SmSirt2 dans les processus de spermatogénèse et d'ovogénèse. Les expériences d'ARN interférence seront répétées et la diminution de l'expression de la protéine SmSirt2 sera étudiée par Western Blot. Dans ces prochaines expériences la durée de l'interférence du transcrit *SmSirt2* sera augmentée afin de diminuer significativement l'expression de la protéine. Les résultats obtenus permettront de mettre en évidence un rôle éventuel de cette enzyme dans la reproduction des vers de schistosomes. L'invalidation de *SmSirt1* par ARN interférence a permis d'obtenir un phénotype au niveau de l'ovaire identique à celui établi après traitement des vers avec des inhibiteurs génériques de sirtuines humaines. Cependant, aucun phénotype n'a été observé dans les testicules des vers. Pour compléter ces résultats, nous envisageons d'étudier l'effet de l'invalidation simultanée des transcrits *SmSirt1* et *SmSirt2* sur les gonades du schistosome afin de mettre en évidence une potentialisation de l'effet de l'invalidation du gène codant SmSirt1. De plus il nous faudra étudier si une diminution du transcrit de SmSirt2 par ARNi n'est pas compensée par une augmentation de l'expression de SmSirt1 et inversement. Ces résultats permettront de montrer si SmSirt1 et SmSirt2 présentent des fonctions biologiques interchangeable. Toutefois, la sélectivité des inhibiteurs de SmSirt2 issus du criblage à haut débit n'est pas établie et il semble vraisemblable qu'ils inhibent à la fois SmSirt1 et SmSirt2.

La modélisation de la structure de SmSirt2 par homologie avec celle de son orthologue humain nous permettra d'étudier la fixation de ces inhibiteurs dans le site catalytique de l'enzyme. A ce jour, la comparaison de la structure de SmSirt2 avec l'enzyme humaine nous a déjà permis de montrer qu'il existe des différences structurales au niveau du site catalytique de ces deux enzymes. Ces différences seront exploitées afin d'optimiser chimiquement les inhibiteurs de SmSirt2 que nous avons identifiés au cours du criblage à haut débit pour augmenter leur sélectivité vis-à-vis de l'enzyme du schistosome.

Toutefois, le statut de SmSirt2 en tant que cible thérapeutique unique pour le développement de nouveaux médicaments n'est pas encore établi. Les résultats obtenus à la suite de l'ARNi ne nous permettent pas à ce jour d'affirmer que l'inhibition de cette enzyme affectera la viabilité des parasites *in vivo*. C'est pourquoi nous avons mené en parallèle des études sur SmSirt1 qui, malgré les difficultés que nous avons rencontrées pour produire l'enzyme recombinantes, semble être une cible thérapeutique valide.

Initiation de l'étude du rôle biologique de SmSirt1

Pour finir, nous avons entrepris d'étudier plus particulièrement le rôle biologique de SmSirt1 chez *S. mansoni*. Ainsi, nous avons réalisé un criblage d'une banque d'ADNc de vers adultes par la technique du double hybride en levure dans le but d'identifier des partenaires protéiques de SmSirt1. Ainsi, nous avons pu identifier que cette enzyme interagit avec des protéines impliquées dans la transcription des gènes, l'épissage des ARN(s) ainsi que dans la traduction des protéines. De plus, certains partenaires que nous avons identifiés sont des protéines mitochondriales ou des protéines associées au cytosquelette ainsi qu'à la matrice extracellulaire. Cependant, les partenaires de SmSirt1 que nous avons identifié chez le schistosome sont différents de ceux déjà décrits dans la littérature pour son orthologue présent chez l'homme. Par exemple, il a été montré que Sirt1 se fixe à p53 et entraîne son inactivation en désacétylant spécifiquement son résidu lysine en position 382 [Vaziri *et al.*, 2001]. De plus, en réponse au stress oxydatif, Sirt1 forme un complexe avec FoxO3 et entraîne sa désacétylation *in vitro* et dans des cellules [Brunet *et al.*, 2004]. Pour finir, Sirt1 peut également interagir et désacétyler PGC1- α , un coactivateur de la transcription dans le but de contrôler, dans le foie, les voies impliquées dans le métabolisme du glucose [Rodgers *et al.*, 2005]. Au cours de notre criblage en double hybride, aucune de ces protéines n'a été identifiée. Néanmoins, il se peut que ces interactions soient spécifiques de l'homme et qu'elles soient absentes chez le schistosome. Bien que le système de criblage en double hybride de levure soit une méthode intéressante pour initier l'étude des interactions protéine-protéine, celui-ci présente des inconvénients. En effet, toutes les interactions ne sont pas visibles et leur détection de façon binaire ne permet pas l'identification de complexes multiprotéiques. De plus, la localisation nucléaire du système rapporteur nécessite que les protéines présentent une conformation au sein du noyau identique à leur conformation native dans une cellule. Par ailleurs, la toxicité de certaines protéines empêche leur analyse dans ce système. Pour finir, au cours de notre criblage, le nombre important de clones positifs que nous avons identifiés nous a contraints à étudier qu'une partie d'entre eux.

Cependant, dans un premier temps, il serait intéressant de confirmer certaines des interactions que nous avons identifiées par co-immunoprécipitation en ovocyte de xénope puis d'étudier plus précisément leur rôle biologique chez le schistosome. Nous envisageons également d'étudier ces interactions entre des protéines humaines afin de montrer si ces dernières existent également chez l'homme ou si elles sont spécifiques du schistosome. A ce jour, nous avons confirmé par co-immunoprécipitation l'interaction entre SmSirt1 et SmANP32. La caractérisation et l'analyse de la séquence de SmANP32 obtenue par RACE PCR nous a permis de montrer que nous avons cloné l'isoforme SmANP32A. Notre intérêt

s'est porté sur cette protéine car, chez l'homme, ANP32A est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes, la prolifération et la différenciation cellulaire.

La mise au point de l'expression de SmSirt1 en bactérie *E. coli* ou dans des cellules d'insectes transfectées avec des baculovirus ne nous a pas permis d'obtenir une protéine soluble. De plus, l'expression de la protéine tronquée ou celle de son domaine catalytique uniquement n'a pas permis d'obtenir une meilleure solubilité. Cependant, au cours de nos travaux, nous avons montré qu'il était possible d'exprimer SmSirt1 dans des levures *S. cerevisiae*. Il serait donc intéressant d'envisager l'expression et la production de cette protéine dans des levures *Pichia pastoris*, utilisées pour la production de protéines recombinantes. Néanmoins, au cours de ce projet de recherche nous avons mis au point l'expression de SmSirt1 en ovocytes de xénope afin d'envisager d'étudier son activité enzymatique ainsi que son inhibition. Ainsi, nous avons pu montrer que la salermide et le sirtinol, deux inhibiteurs de sirtuines humaines, inhibent également SmSirt1. L'utilisation de ce modèle est toutefois limitée et ne permet pas d'étudier quantitativement l'inhibition de SmSirt1 par différents inhibiteurs. Cependant, par la suite, nous envisageons d'utiliser ce dosage afin d'étudier la sélectivité de certains inhibiteurs de SmSirt2 que nous avons identifiés au cours du criblage à haut débit.

Au cours de ce projet de recherche et plus généralement au cours du projet SEtTReND, notre objectif a été d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin de développer de nouveaux précurseurs de médicaments pour traiter la schistosomiase. L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de montrer que SmHDAC8 est une cible thérapeutique prometteuse. De plus, les travaux que nous avons initiés concernant SmSirt2 ont permis d'obtenir des résultats encourageants mais qui devront être confirmés puis complétés afin d'affirmer que cette enzyme est une cible thérapeutique intéressante. Il faudra, entre autres, par homologie avec la démarche entreprise pour valider SmHDAC8 comme cible, démontrer que cette enzyme est indispensable au développement du parasite *in vivo*. Pour ce faire, des schistosomules interférés pour le gène codant SmSirt2 seront injectés dans des souris afin d'étudier le développement des vers et de quantifier la production des œufs après 35 jours d'infestation. Ces résultats nous permettront, en plus de ceux obtenus après l'interférence de vers adultes *in vitro*, de démontrer que SmSirt2 est une cible intéressante.

Toutefois, la production de ces enzymes sous forme de protéines recombinantes et l'analyse de leur structure après cristallisation ou à l'aide de modélisation nous ont permis d'étudier leur inhibition et d'identifier de nouvelles molécules, précurseurs de médicament. Par la suite, l'effet de ces composés a été étudié *in vitro* sur des parasites et/ou *in vivo* dans un

modèle de souris infectées par le schistosome. A ce jour, certaines molécules prometteuses ont été identifiées et font actuellement l'objet d'une bio-optimisation afin d'augmenter leur spécificité et leur activité pour l'enzyme du parasite. Comme nous l'avons vu précédemment, les sirtuines sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires et la dérégulation de leur activité est associée à de nombreuses pathologies. Chez l'homme, la sélectivité d'un inhibiteur de sirtuine est essentielle pour éviter le développement d'effets secondaires. Afin de prévenir ces effets indésirables pour les composés que nous avons identifiés, il nous faudra augmenter leur spécificité pour les enzymes du parasite. Cependant chez le parasite, la sélectivité pour une sirtuine spécifique ne semble pas fondamentale. En effet la dérégulation de l'activité de plusieurs sirtuines dans le parasite pourrait être intéressante pour affecter significativement sa viabilité. A plus long terme, l'objectif est de continuer nos investigations afin d'obtenir un (ou plusieurs) composé(s) susceptible(s) d'entrer en phase préclinique puis clinique.

Cependant, pour aboutir à un candidat médicament, il nous reste encore à prouver la sélectivité de nos composés, à évaluer leur sécurité puis à étudier *in vivo* leur efficacité. Afin d'étudier le comportement et d'affirmer l'innocuité d'un candidat médicament prometteur, il nous faudra étudier *in vitro* puis chez l'animal ses propriétés pharmacologiques, pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et toxicologiques. Après avoir réalisé l'ensemble de ces tests, les essais cliniques sur des volontaires sains, puis sur les premiers patients pourront débuter. En parallèle du développement clinique, il faudra mettre au point la forme galénique la mieux adaptée et si nécessaire un système d'administration approprié. Dans le cas du traitement de la schistosomiase, le médicament « idéal » devra être efficace en dose unique et administré par voie orale.

Il est important de rappeler ici que le développement d'un médicament est un processus long et coûteux. En effet, on estime que chaque médicament développé pour un marché mondial coûte de 350 à 800 millions d'euros et que la durée totale de son développement varie de 8 à 12 ans. Le développement de nouveaux médicaments pour traiter la schistosomiase est à ce jour devenu indispensable. Cette pathologie est considérée comme une maladie tropicale négligée qui affecte des populations défavorisées dans des pays sous-développés ou en voie de développement. Ainsi, nous pouvons nous interroger sur le financement à la fois du développement de nouvelles drogues anti-schistomales mais aussi sur celui de la distribution du médicament aux populations touchées. Actuellement la société Merck fournit gratuitement le PZQ aux populations mais nous pouvons nous demander combien de temps cette société pharmaceutique pourra financer cette action. Enfin, l'éradication de la schistosomiase dans les zones endémiques nécessite une approche globale dans laquelle la

chimiothérapie devra être accompagnée d'une éducation sanitaire des populations et d'une lutte vectorielle contre l'hôte intermédiaire du schistosome.

Au cours des 3 prochaines années, sur la base de la stratégie développée au cours du projet SEtTReND, notre étude sera élargie à d'autres parasites de l'homme tels que *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* ainsi qu'à plusieurs espèces de *Leishmania*. Ce projet, A-PARADDISE (Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics) sera financé par la Commission Européenne et aura pour objectif de développer et d'optimiser de nouveaux inhibiteurs sélectifs d'enzymes impliquées dans la modification des histones dans les 4 parasites étudiés.

BIBLIOGRAPHIE

- A -

Aihara H., Nakagawa T., Yasui K., Ohta T., Hirose S., Dhomae N., Takio K., Kaneko M., Takeshima Y., Muramatsu M., Ito T., Nucleosomal histone kinase-1 phosphorylates H2A Thr 119 during mitosis in the early *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 18(8): 877-88 (2004)

Alhazzazi T.Y., Kamarajan P., Joo N., Huang J.Y., Verdin E., D'Silva N.J., Kapila Y.L., Sirtuin-3 (SIRT3), a novel potential therapeutic target for oral cancer. *Cancer.* 117(8): 1670-78 (2011)

Allis C.D., Glover C.V., Bowen J.K., Gorovsky M.A., Histone variants specific to the transcriptionally active, amitotically dividing macronucleus of the unicellular eucaryote, *Tetrahymena thermophila*. *Cell.* 20(3): 609-17 (1980)

Anderson L., Pierce R.J., Verjovski-Almeida S., *Schistosoma mansoni* histones: from transcription to chromatin regulation an in silico analysis. *Mol Biochem Parasitol.* 183(2): 105-14 (2012)

Angelov D., Molla A., Perche P.Y., Hans F., Côté J., Khochbin S., Bouvet P., Dimitrov S., The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol Cell.* 11(4): 1033-41 (2003)

Araki T., Sasaki Y., Milbrandt J., Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science.* 305(5686): 1010-13 (2004)

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(5): 384-400 (2012)

Avalos J.L., Bever K.M., Wolberger C., Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD(+) cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme. *Mol Cell.* 17(6): 855-68 (2005)

Avalos J.L., Celic I., Muhammad S., Cosgrove M.S., Boeke J.D., Wolberger C., Structure of a Sir2 enzyme bound to an acetylated p53 peptide. *Mol Cell.* 10(3): 523-35 (2002)

Avvakumov N., Côté J., The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene.* 26(37): 5395-407 (2007)

- B -

Baek S.H., Ohgi K.A., Rose D.W., Koo E.H., Glass C.K., Rosenfeld M.G., Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 co-activator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell.* 110: 55-67 (2002)

Banks D.D., Gloss L.M., Equilibrium folding of the core histones: the H3-H4 tetramer is less stable than the H2A-H2B dimer. *Biochemistry.* 42(22): 6827-39 (2003)

Bannister A.J., Kouzarides T., Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21: 381-95 (2011)

- Bannister A.J., Schneider R., Kouzarides T., Histone methylation: Dynamic or static? *Cell*. 109: 801-806 (2002)
- Barber M.F., Michishita-Kioi E., Xi Y., Tasselli L., Kioi M., Moqtaderi Z., Tennen R.I., Paredes S., Young N.L., Chen K., Struhl K., Garcia B.A., Gozani O., Li W., Chua K.F., SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature*. (7405): 114-18 (2012)
- Barneda-Zahonero B., Parra M., Histone deacetylases and cancer. *Mol Oncol*. 6(6): 579-89 (2012)
- Baxevanis A.D., Godfrey J.E., Moudrianakis E.N., Associative behavior of the histone (H3-H4)₂ tetramer: dependence on ionic environment. *Biochemistry*. 30(36): 8817-23 (1991)
- Beadle G.W., Tatum E.L., Genetic Control of Biochemical Reactions in Neurospora. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27(11): 499-506 (1941)
- Bedalov A., Gatbonton T., Irvine W.P., Gottschling D.E., Simon J.A., Identification of a small molecule inhibitor of Sir2p. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(26): 15113-18 (2001)
- Beirowski B., Gustin J., Armour S.M., Yamamoto H., Viader A., North B.J., Michán S., Baloh R.H., Golden J.P., Schmidt R.E., Sinclair D.A., Auwerx J., Milbrandt J., Sir-two-homolog 2 (Sirt2) modulates peripheral myelination through polarity protein Par-3/atypical protein kinase C (aPKC) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(43): 952-61 (2011)
- Berns K., Hijmans E.M., Mullenders J., Brummelkamp T.R., Velds A., Heimerikx M., Kerkhoven R.M., Madiredjo M., Nijkamp W., Weigelt B., Agami R., Ge W., Cavet G., Linsley P.S., Beijersbergen R.L., Bernards R., A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature*. 428: 431-37 (2004)
- Berriman M., Haas B.J., LoVerde P.T., Wilson R.A., Dillon G.P., Cerqueira G.C., Mashiyama S.T., Al-Lazikani B., Andrade L.F., Ashton P.D., Aslett M.A., Bartholomeu D.C., Blandin G., Caffrey C.R., Coghlan A., Coulson R., Day T.A., Delcher A., DeMarco R., Djikeng A., Eyre T., Gamble J.A., Ghedin E., Gu Y., Hertz-Fowler C., Hirai H., Hirai Y., Houston R., Ivens A., Johnston D.A., Lacerda D., Macedo C.D., McVeigh P., Ning Z., Oliveira G., Overington J.P., Parkhill J., Pertea M., Pierce R.J., Protasio A.V., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Sajid M., Salzberg S.L., Stanke M., Tivey A.R., White O., Williams D.L., Wortman J., Wu W., Zamanian M., Zerlotini A., Fraser-Liggett C.M., Barrell B.G., El-Sayed N.M., The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*. 460(7253): 352-58 (2009)
- Bertin B., Oger F., Cornette J., Caby S., Noël C., Pierce R.J., (2006) *Schistosoma mansoni* CBP/p300 has a conserved domain structure and interacts functionally with the nuclear receptor SmFtz-F1. *Mol Biochem Parasitol*. 146: 180-91 (2006)
- Bjerling P., Silverstein R.A., Thon G., Caudy A., Grewal S., Ekwall K., Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and in vivo specificity. *Mol Cell Biol*. 22(7): 2170-81 (2002)
- Blander G., Guarente L., The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem*. 73: 417-35 (2004)

Boily G., Seifert E.L., Bevilacqua L., He X.H., Sabourin G., Estey C., Moffat C., Crawford S., Saliba S., Jardine K., Xuan J., Evans M., Harper M.E., McBurney M.W., Sirt1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice. *PLoS One*. 3(3): e1759 (2008)

Bolden J.E., Peart M.J., Johnstone R.W., Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 5(9): 769-84 (2006)

Bordone L., Guarente L., Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(4): 298-305 (2005)

Bordone L., Motta M.C., Picard F., Robinson A., Jhala U.S., Apfeld J., McDonagh T., Lemieux M., McBurney M., Szilvasi A., Easlou E.J., Lin S.J., Guarente L., Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol*. 4(9): e295 (2006)

Borra M.T., O'Neill F.J., Jackson M.D., Marshall B., Verdin E., Foltz K.R., Denu J.M., Conserved enzymatic production and biological effect of O-acetyl-ADP-ribose by silent information regulator 2-like NAD⁺-dependent deacetylases. *J Biol Chem*. 277(15): 12632-41 (2002)

Borra M.T., Smith B.C., Denu J.M., Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem*. 280(17): 17187-95 (2005)

Brachmann C.B., Sherman J.M., Devine S.E., Cameron E.E., Pillus L., Boeke J.D., The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev*. 9(23): 2888-902 (1995)

Brady M.E., Ozanne D.M., Gaughan L., Waite I., Cook S., Neal D.E., Robson C.N., Tip60 is a nuclear hormone receptor co-activator. *J Biol Chem*. 274: 17599-604 (1999)

Brownell J.E., Allis C.D., Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev*. 6: 176-84 (1996)

Brownell J.E., Zhou J., Ranalli T., Kobayashi R., Edmondson D.G., Roth S.Y., Allis C.D., *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a transcriptional co-activator linking gene expression to histone acetylation. *Cell*. 84: 843-51 (1996)

Brunet A., Sweeney L.B., Sturgill J.F., Chua K.F., Greer P.L., Lin Y., Tran H., Ross S.E., Mostoslavsky R., Cohen H.Y., Hu L.S., Cheng H.L., Jedrychowski M.P., Gygi S.P., Sinclair D.A., Alt F.W., Greenberg M.E., Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*. 303(5666): 2011-15 (2004).

Bruzzone S., Parenti M.D., Grozio A., Ballestrero A., Bauer I., Del Rio A., Nencioni A., Rejuvenating sirtuins: the rise of a new family of cancer drug targets. *Curr Pharm Des*. 19(4): 614-23 (2013)

- C -

Caby S., Pierce R.J., Quantitative chromatin immunoprecipitation (Q-ChIP) applied to *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*. 166(1): 77-80 (2009)

Cairns B.R., Kim Y.J., Sayre M.H., Laurent B.C., Kornberg R.D., A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(5): 1950-54 (1994)

Campos E.I., Fillingham J., Li G., Zheng H., Voigt P., Kuo W.H., Seepany H., Gao Z., Day L.A., Greenblatt J.F., Reinberg D., The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4. *Nat Struct Mol Biol.* 17(11): 1343-51 (2010)

Candau R., Moore P.A., Wang L., Barlev N., Ying C.Y., Rosen C.A., Berger S.L., Identification of human proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5. *Mol Cell Biol.* 16: 593-602 (1996)

Cao J., Yan Q., Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. *Front Oncol.* 2: 26 (2012)

Cao R., Tsukada Y., Zhang Y., Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell.* 20(6): 845-54 (2005)

Capron A., Riveau G., Capron M., Trottein F., Schistosomes: the road from host-parasite interactions to vaccines in clinical trials. *Trends Parasitol.* 21(3): 143-49 (2005)

Case D.A., Cheatham T.E., Darden T., Gohlke H., Luo R., Merz K.M., Onufriev A., Simmerling C., Wang B., Woods R.J., The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem.* 16: 1668-88 (2005)

Chakrabarty S.P., Saikumari Y.K., Bopanna M.P., Balaram H., Biochemical characterization of Plasmodium falciparum Sir2, a NAD⁺-dependent deacetylase. *Mol Biochem Parasitol.* 158(2): 139-51 (2008)

Chakravarthy S., Gundimella S.K., Caron C., Perche P.Y., Pehrson J.R., Khochbin S., Luger K., Structural characterization of the histone variant macroH2A. *Mol Cell Biol.* 25(17): 7616-24 (2005)

Chakravarthy S., Luger K., The histone variant macro-H2A preferentially forms "hybrid nucleosomes". *J Biol Chem.* 281(35): 25522-31 (2006)

Chan H.M., La Thangue N.B., p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci.* 114: 2363-73 (2001)

Chauhan D., Bandi M., Singh A.V., Ray A., Raje N., Richardson P., Anderson K.C., Preclinical evaluation of a novel SIRT1 modulator SRT1720 in multiple myeloma cells. *Br J Haematol.* 155(5): 588-98 (2011)

Chen H.Y., Sun J.M., Zhang Y., Davie J.R., Meistrich M.L., Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *J Biol Chem.* 273(21): 13165-69 (1998)

Chen J., Zhou Y., Mueller-Steiner S., Chen L.F., Kwon H., Yi S., Mucke L., Gan L., SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. *J Biol Chem.* 280(48): 40364-74 (2005)

Clapier C.R., Längst G., Corona D.F., Becker P.B., Nightingale K.P., Critical role for the histone H4 N terminus in nucleosome remodeling by ISWI. *Mol Cell Biol.* 21(3): 875-83 (2001)

Clarkson M.J., Wells J.R., Gibson F., Saint R., Tremethick D.J., Regions of variant histone His2AvD required for Drosophila development. *Nature.* 399(6737): 694-97 (1999)

Correns C., G. Mendel's law concerning the behavior of progeny of varietal hybrids. *Genetics.* 35(2): 33-41 (1950)

Cosseau C., Azzi A., Smith K., Freitag M., Mitta G., Grunau C., Native chromatin immunoprecipitation (N-ChIP) and ChIP-Seq of Schistosoma mansoni: Critical experimental parameters. *Mol Biochem Parasitol.* 166(1): 70-76 (2009)

Costanzi C., Pehrson J.R., Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature.* 393(6685): 599-601 (1998)

Coura-Filho P., Mendes N.M., de Souza C.P., Pereira J.P., The prolonged use of niclosamide as a molluscicide for the control of Schistosoma mansoni. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 34(5): 427-31 (1992)

Cribb T.H., Bray R.A., Littlewood D.T.J., Pichelin SP, Herniou EA., The Digenea. In "Interrelationships of the Platyhelminthes". *Littlewood DTJ et Bray RA eds.*, 168-185 (2001)

Cuénot L., La loi de Mendel et l'hérédité de la pigmentation chez les souris. *Arch Zool Exp Gen Ser.* 3(10) : 37-40 (1902)

Cvetanovic M., Rooney R.J., Garcia J.J., Toporovskaya N., Zoghbi H.Y., Opal P., The role of LANP and ataxin 1 in E4F-mediated transcriptional repression. *EMBO Rep.* 8(7): 671-77 (2007)

- D -

Dahm R., Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev Biol.* 278(2): 274-88 (2005)

De La Barre A.E., Gerson V., Gout S., Creaven M., Allis C.D., Dimitrov S., Core histone N-termini play an essential role in mitotic chromosome condensation. *EMBO J.* 19(3): 379-91 (2000)

Deardorff M.A., Bando M., Nakato R., Watrin E., Itoh T., Minamino M., Saitoh K., Komata M., Katou Y., Clark D., Cole K.E., De Baere E., Decroos C., Di Donato N., Ernst S., Francey L.J., Gyftodimou Y., Hirashima K., Hullings M., Ishikawa Y., Jaulin C., Kaur M., Kiyono T., Lombardi P.M., Magnaghi-Jaulin L., Mortier G.R., Nozaki N., Petersen M.B., Seimiya H., Siu V.M., Suzuki Y., Takagaki K., Wilde J.J., Willems P.J., Prigent C., Gillesen-Kaesbach G., Christianson D.W., Kaiser F.J., Jackson L.G., Hirota T., Krantz I.D., Shirahige K., HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesion acetylation cycle. *Nature.* 489(7415): 313-17 (2012)

Dechassa M.L., Sabri A., Pondugula S., Kassabov S.R., Chatterjee N., Klädde M.P., Bartholomew B., SWI/SNF has intrinsic nucleosome disassembly activity that is dependent on adjacent nucleosomes. *Mol Cell.* 38(4): 590-602 (2010)

Doil C., Mailand N., Bekker-Jensen S., Menard P., Larsen D.H., Pepperkok R., Ellenberg J., Panier S., Durocher D., Bartek J., Lukas J., Lukas C., RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell*. 136(3): 435-46 (2009)

Dominy J.E., Lee Y., Jedrychowski M.P., Chim H., Jurczak M.J., Camporez J.P., Ruan H.B., Feldman J., Pierce K., Mostoslavsky R., Denu J.M., Clish C.B., Yang X., Shulman G.I., Gygi S.P., Puigserver P., The deacetylase Sirt6 activates the acetyltransferase GCN5 and suppresses hepatic gluconeogenesis. *Mol Cell*. 48(6): 900-13 (2012)

Doyon Y., Cayrou C., Ullah M., Landry A.J., Cote V., Selleck W., Lane W.S., Tan S., Yang X.J., Côté J., ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell*. 21: 51-64 (2006)

Doyon Y., Selleck W., Lane W.S., Tan S., Cote J., Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol Cell Biol*. 24: 1884-96 (2004)

Dryden S.C., Nahhas F.A., Nowak J.E., Goustin A.S., Tainsky M.A., Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Mol Cell Biol*. 23(9): 3173-85 (2003)

Du J., Zhou Y., Su X., Yu J.J., Khan S., Jiang H., Kim J., Woo J., Kim J.H., Choi B.H., He B., Chen W., Zhang S., Cerione R.A., Auwerx J., Hao Q., Lin H., Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science*. 334(6057): 806-809 (2011)

Dubois F., Caby S., Oger F., Cosseau C., Capron M., Grunau C., Dissous C., Pierce R.J., Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*. 168(1): 7-15 (2009)

Dutnall R.N., Tafrov S.T., Sternglanz R., Ramakrishnan V., Structure of the histone acetyltransferase Hat1: a paradigm for the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily. *Cell*. 94: 427-38 (1998)

- E -

Eisen J.A., Sweder K.S., Hanawalt P.C., Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res*. 23(14): 2715-23 (1995)

Eissenberg J.C., Structural biology of the chromodomain: form and function. *Gene*. 496(2): 69-78 (2012)

Ellis R.J., Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. *Trends Biochem Sci*. 31(7): 395-401 (2006)

Elsässer S.J., D'Arcy S., Towards a mechanism for histone chaperones. *Biochim Biophys Acta*. 1819(3-4): 211-21 (2012)

Enkhbayar P., Kamiya M., Osaki M., Matsumoto T., Matsushima N., Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins. *Proteins*. 54 (3): 394-403 (2004)

Eskandarian H.A., Impens F., Nahori M.A., Soubigou G., Coppée J.Y., Cossart P., Hamon M.A., A role for SIRT2-dependent histone H3K18 deacetylation in bacterial infection. *Science*. 341(6145): 1238858 (2013)

- F -

Faast R., Thonglairoam V., Schulz T.C., Beall J., Wells J.R., Taylor H., Matthaei K., Rathjen P.D., Tremethick D.J., Lyons I., Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr Biol*. 11(15): 1183-87 (2001)

Fallon P.G., Doenhoff M.J., Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am J Trop Med Hyg*. 51(1): 83-88 (1994)

Fantappié M.R., Gimba E.R., Rumjanek F.D., Lack of DNA methylation in *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol*. 98(3): 162-66 (2001)

Feldman J.L., Dittenhafer-Reed K.E., Denu J.M., Sirtuin catalysis and regulation. *J Biol Chem*. 287(51): 42419-27 (2012)

Felsenfeld G., Groudine M., Controlling the double helix. *Nature*. 421(6921): 448-53 (2003)

Feng Q., Wang H., Ng H.H., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Struhl K., Zhang Y., Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol*. 12: 1052-58 (2002)

Fenwick A., Savioli L., Engels D., Robert Bergquist N., Todd MH., Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. *Trends Parasitol*. 19(11): 509-15 (2003)

Finley L.W., Carracedo A., Lee J., Souza A., Egia A., Zhang J., Teruya-Feldstein J., Moreira P.I., Cardoso S.M., Clish C.B., Pandolfi P.P., Haigis M.C., SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1 α destabilization. *Cancer Cell*. 19(3): 416-28 (2011)

Finn R.D., Tate J., Mistry J., Coggill P.C., Sammut S.J., Hotz H.R., Ceric G., Forslund K., Eddy S.R., Sonnhammer E.L., Bateman A., The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*. 36: D281-8 (2008)

Finnin M.S., Donigian J.R., Pavletich N.P., Structure of the histone deacetylase SIRT2. *Nat Struct Biol*. 8(7): 621-5 (2001)

Firestein R., Blander G., Michan S., Oberdoerffer P., Ogino S., Campbell J., Bhimavarapu A., Luikenhuis S., de Cabo R., Fuchs C., Hahn W.C., Guarente L.P., Sinclair D.A., The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS One*. 3(4): e2020 (2008)

Fischle W., Dequiedt F., Hendzel M.J., Guenther M.G., Lazar M.A., Voelter W., Verdin E., Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Mol Cell*. 9(1): 45-57 (2002)

Flemming W., Zur Kenntniss der Zelle und ihrer Theilungs-Erscheinungen. *Schr nat wiss Ver Schlesw-Holst*. 3: 23-27 (1878)

Ford E., Voit R., Liszt G., Magin C., Grummt I., Guarente L., Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev.* 20(9): 1075-80 (2006)

Fraga M.F., Ballestar E., Villar-Garea A., Boix-Chornet M., Espada J., Schotta G., Bonaldi T., Haydon C., Ropero S., Petrie K., Iyer N.G., Pérez-Rosado A., Calvo E., Lopez J.A., Cano A., Calasanz M.J., Colomer D., Piris M.A., Ahn N., Imhof A., Caldas C., Jenuwein T., Esteller M., Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* 37(4): 391-400 (2005)

Franceschini A., Szklarczyk D., Frankild S., Kuhn M., Simonovic M., Roth A., Lin J., Minguez P., Bork P., von Mering C., Jensen L.J., STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue): D808-15 (2013)

Frescas D., Valenti L., Accili D., Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem.* 280(21): 20589-95 (2005)

Frye R.A., Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 273(2): 793-98 (2000)

Fulco M., Schiltz R.L., Iezzi S., King M.T., Zhao P., Kashiwaya Y., Hoffman E., Veech R.L., Sartorelli V., Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell.* 12(1): 51-62 (2003)

- G -

Gao L., Cueto M.A., Asselbergs F., Atadja P., Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem.* 277(28): 25748-55 (2002)

Georgakopoulos T., Thireos G., Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *EMBO J.* 11: 4145-52 (1992)

Georgiakaki M., Chabbert-Buffet N., Dasen B., Meduri G., Wenk S., Rajhi L., Amazit L., Chauchereau A., Burger C.W., Blok L.J., Milgrom E., Lombès M., Guiochon-Mantel A., Loosfelt H., Ligand-controlled interaction of HBO1 with the N-terminal transactivating domain of progesterone receptor induces SRC-1-dependent co-activation of transcription. *Mol Endocrinol.* 20: 2122-40 (2006)

Geyer K.K., Rodríguez López C.M., Chalmers I.W., Munshi S.E., Truscott M., Heald J., Wilkinson M.J., Hoffmann K.F., Cytosine methylation regulates oviposition in the pathogenic blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nat Commun.* 2: 424 (2011)

Giammona L.M., Panuganti S., Kemper J.M., Apostolidis P.A., Lindsey S., Papoutsakis E.T., Miller W.M., Mechanistic studies on the effects of nicotinamide on megakaryocytic polyploidization and the roles of NAD⁺ levels and SIRT inhibition. *Exp Hematol.* 37(11): 1340-52 (2009)

Gil R., Barth S., Kanfi Y., Cohen H.Y., SIRT6 exhibits nucleosome-dependent deacetylase activity. *Nucleic Acids Res.* 41(18): 8537-45 (2013)

Goldknopf I.L., Taylor C.W., Baum R.M., Yeoman L.C., Olson M.O., Prestayko A.W., Busch H., Isolation and characterization of protein A24, a "histone-like" non-histone chromosomal protein. *J Biol Chem.* 250(18): 7182-87 (1975)

Greiss S., Gartner A., Sirtuin/Sir2 phylogeny, evolutionary considerations and structural conservation. *Mol Cells.* 28(5): 407-15 (2009)

Grossman A.I., Short R.B., Cain G.D., Karyotype evolution and sex chromosome differentiation in Schistosomes (Trematoda, Schistosomatidae). *Chromosoma.* 84(3): 413-30 (1981)

Grozinger C.M., Chao E.D., Blackwell H.E., Moazed D., Schreiber S.L., Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *J Biol Chem.* 276(42): 38837-43 (2001)

- H -

Haigis M.C., Mostoslavsky R., Haigis K.M., Fahie K., Christodoulou D.C., Murphy A.J., Valenzuela D.M., Yancopoulos G.D., Karow M., Blander G., Wolberger C., Prolla T.A., Weindruch R., Alt F.W., Guarente L., SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell.* 126(5): 941-54 (2006)

Haigis M.C., Sinclair D.A., Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol.* 5: 253-95 (2010)

Hallows W.C., Lee S., Denu J.M., Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(27): 10230-35 (2006)

Heltweg B., Dequiedt F., Verdin E., Jung M., Nonisotopic substrate for assaying both human zinc and NAD⁺-dependent histone deacetylases. *Anal Biochem.* 319(1): 42-48 (2003)

Hendrich B., Bird A., Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol.* 18(11): 6538-47 (1998)

Hirschey M.D., Shimazu T., Goetzman E., Jing E., Schwer B., Lombard D.B., Grueter C.A., Harris C., Biddinger S., Ilkayeva O.R., Stevens R.D., Li Y., Saha A.K., Ruderman N.B., Bain J.R., Newgard C.B., Farese R.V., Alt F.W., Kahn C.R., Verdin E., SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature.* 464(7285): 121-25 (2010)

Holliday R., Pugh J.E., DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science.* 187(4173): 226-32 (1975)

Howitz K.T., Bitterman K.J., Cohen H.Y., Lamming D.W., Lavu S., Wood J.G., Zipkin R.E., Chung P., Kisielewski A., Zhang L.L., Scherer B., Sinclair D.A., Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 425(6954): 191-96 (2003)

Hubbard B.P., Gomes A.P., Dai H., Li J., Case A.W., Considine T., Riera T.V., Lee J.E., E S.Y., Lamming D.W., Pentelute B.L., Schuman E.R., Stevens L.A., Ling A.J., Armour S.M., Michan S., Zhao H., Jiang Y., Sweitzer S.M., Blum C.A., Disch J.S., Ng P.Y., Howitz K.T., Rolo A.P., Hamuro Y., Moss J., Perni R.B., Ellis J.L., Vlasuk G.P., Sinclair D.A., Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *339(6124)*: 1216-19 (2013)

Hubbert C., Guardiola A., Shao R., Kawaguchi Y., Ito A., Nixon A., Yoshida M., Wang X.F., Yao T.P., HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*. 417(6887): 455-58 (2002)

Hulo N., Bairoch A., Bulliard V., Cerutti L., Cuche B.A., de Castro E., Lachaize C., Langendijk-Genevaux P.S., Sigrist C.J., The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Res*. 36: 245-49 (2008)

- I -

Ismail M., Botros S., Metwally A., William S., Farghally A., Tao L.F., Day T.A., Bennett J.L., Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am J Trop Med Hyg*. 60(6): 932-35 (1999)

- J -

Jacob F., Monod J., Biochemical and Genetic Mechanisms of Regulation in the Bacterial Cell. *Bull Soc Chim Biol*. 46: 1499-532 (1964)

Jacob F., Monod J., Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J mol biol*. 3: 318-56 (1961)

Jenuwein T., Allis C.D., Translating the histone code. *Science*. 293(5532): 1074-80 (2001)

Jiang H., Khan S., Wang Y., Charron G., He B., Sebastian C., Du J., Kim R., Ge E., Mostoslavsky R., Hang H.C., Hao Q., Lin H., SIRT6 regulates TNF- α secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature*. 496(7443): 110-13 (2013)

Jones D.O., Cowell I.G., Singh P.B., Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *Bioessays*. 22(2): 124-37 (2000)

Jordan P., Schistosomiasis: The St Lucia Project. *Cambridge University Press* (1985)

- K -

Kaeberlein M., McVey M., Guarente L., The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev*. 13(19): 2570-80 (1999)

Kagan I.G., Oliver-Gonzalez J., Hemagglutination studies with schistosome antigens. *J Parasitol*. 44(5): 457-60 (1958)

Kamine J., Elangovan B., Subramanian T., Coleman D., Chinnadurai G., Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology*. 216: 357-66 (1996)

- Kariuki H.C., Madsen H., Ouma J.H., Butterworth A.E., Dunne D.W., Booth M., Kimani G., Mwatha J.K., Muchiri E., Vennervald B.J., Long term study on the effect of mollusciciding with niclosamide in stream habitats on the transmission of schistosomiasis mansoni after community-based chemotherapy in Makueni District, Kenya. *Parasit Vectors*. 6(1): 107 (2013)
- Karlic R., Chung H.R., Lasserre J., Vlahovicek K., Vingron M., Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107: 2926-31 (2010)
- Katz N., Coelho P.M., Pellegrino J., Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human feces. *J Parasitol*. 56(5): 1032-33 (1970)
- Kaufman P.D., Kobayashi R., Kessler N., Stillman B., The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication. *Cell*. 81(7): 1105-14 (1995)
- Kaur S, Shivange AV, Roy N. Structural analysis of trypanosomal sirtuin: an insight for selective drug design. *Mol Divers*. 14(1): 169-78 (2010)
- Kawahara T.L., Michishita E., Adler A.S., Damian M., Berber E., Lin M., McCord R.A., Ongaigui K.C., Boxer L.D., Chang H.Y., Chua K.F., SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell*. 136(1): 62-74 (2009)
- Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol*. 28(10): 1069-78 (2010)
- Kim H.S., Patel K., Muldoon-Jacobs K., Bisht K.S., Aykin-Burns N., Pennington J.D., van der Meer R., Nguyen P., Savage J., Owens K.M., Vassilopoulos A., Ozden O., Park S.H., Singh K.K., Abdulkadir S.A., Spitz D.R., Deng C.X., Gius D., SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell*. 17(1): 41-52 (2010)
- King C.H., Parasites and poverty: the case of schistosomiasis. *Acta Trop*. 113(2): 95-104 (2010)
- King C.H., Dickman K., Tisch D.J., Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet*. 365(9470): 1561-69 (2005)
- King C.H., Sturrock R.F., Kariuki H.C., Hamburger J., Transmission control for schistosomiasis - why it matters now. *Trends Parasitol*. 22(12): 575-82 (2006)
- Kingston R.E., Narlikar G.J., ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev*. 13(18): 2339-52 (1999)
- Kleinschmidt J.A., Steinbeisser H., DNA-dependent phosphorylation of histone H2A.X during nucleosome assembly in *Xenopus laevis* oocytes: involvement of protein phosphorylation in nucleosome spacing. *EMBO J*. 10(10): 3043-50 (1991)

Kobe B., Kajava A.V., The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol.* 11(6): 725-32 (2001)

Koken M.H., Reynolds P., Jaspers-Dekker I., Prakash L., Prakash S., Bootsma D., Hoeijmakers J.H., Structural and functional conservation of two human homologs of the yeast DNA repair gene RAD6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(20): 8865-69 (1991)

Kolas N.K., Chapman J.R., Nakada S., Ylanko J., Chahwan R., Sweeney F.D., Panier S., Mendez M., Wildenhain J., Thomson T.M., Pelletier L., Jackson S.P., Durocher D., Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science.* 318(5856): 1637-40 (2007)

Kouzarides T., Chromatin modifications and their function. *Cell.* 128(4): 693-705. (2007)

Kuo M-H., Brownell J.E., Sobel R.E., Ranalli T.A., Cook R.G., Edmonson D.G., Roth S.Y., Allis C.D., Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature.* 383: 269-272 (1996)

Kurumizaka H., Horikoshi N., Tachiwana H., Kagawa W., Current progress on structural studies of nucleosomes containing histone H3 variants. *Curr Opin Struct Biol.* 23(1): 109-15 (2013)

Kutney S.N., Hong R., Macfarlan T., Chakravarti D., A signaling role of histone-binding proteins and INHAT subunits pp32 and Set/TAF-Ibeta in integrating chromatin hypoacetylation and transcriptional repression. *J Biol Chem.* 279: 30850-55 (2004)

- L -

Lancelot J., Caby S., Dubois-Abdesselem F., Vanderstraete M., Trolet J., Oliveira G., Bracher F., Jung M., Pierce R.J., Schistosoma mansoni Sirtuins: Characterization and Potential as Chemotherapeutic Targets. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(9): e2428 (2013)

Längst G., Becker P.B., ISWI induces nucleosome sliding on nicked DNA. *Mol Cell.* 8(5): 1085-92 (2001)

Lara E., Mai A., Calvanese V., Altucci L., Lopez-Nieva P., Martinez-Chantar M.L., Varela-Rey M., Rotili D., Nebbioso A., Roperio S., Montoya G., Oyarzabal J., Velasco S., Serrano M., Witt M., Villar-Garea A., Imhof A., Mato J.M., Esteller M., Fraga M.F., Salermide, a Sirtuin inhibitor with a strong cancer-specific proapoptotic effect. *Oncogene.* 28(6): 781-91 (2009)

Laskey R.A., Honda B.M., Mills A.D., Finch J.T., Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature.* 275(5679): 416-20 (1978)

Laskowski R.A., Macathur M.W., Moss D.S., Thornton J.M., PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst.* 26: 283-91 (1993)

Lewis F.A., Liang Y.S., Raghavan N., Knight M., The NIH-NIAID schistosomiasis resource center. *PLoS Negl Trop Dis.* 2(7): e267 (2008)

Li B., Carey M., Workman J.L., The role of chromatin during transcription. *Cell.* 128: 707-19 (2007)

Liang Y.S., Dai J.R., Zhu Y.C., Coles G.C., Doenhoff M.J., Genetic analysis of praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 34(2): 274-80 (2003)

Lin S.J., Defossez P.A., Guarente L., Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 289(5487): 2126-28 (2000)

Liu H., Hu Q., D'ercole A.J., Ye P., Histone deacetylase 11 regulates oligodendrocyte-specific gene expression and cell development in OL-1 oligodendroglia cells. *Glia*. 57(1): 1-12 (2009)

Liu Z., Oughtred R., Wing S.S., Characterization of E3Histone, a novel testis ubiquitin protein ligase which ubiquitinates histones. *Mol Cell Biol*. 25(7): 2819-31 (2005)

Lizuka M., Matsui T., Takisawa H., Smith M.M., Regulation of replication licensing by acetyltransferase Hbo1. *Mol Cell Biol*. 26: 1098-108 (2006)

Lorch Y., Maier-Davis B., Kornberg R.D., Chromatin remodeling by nucleosome disassembly in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(9): 3090-93 (2006)

Loven M.A., Davis R.E., Curtis C.D., Muster N., Yates J.R., Nardulli A.M., A novel estrogen receptor alpha-associated protein alters receptor-deoxyribonucleic acid interactions and represses receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol*. 18(11): 2649-59 (2004)

Lusser A., Kadonaga J.T., Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays*. 25(12): 1192-200 (2003)

- M -

Madsen H., Biological methods for the control of freshwater snails. *Parasitol Today*. 6(7): 237-41 (1990)

Mai A., Valente S., Meade S., Carafa V., Tardugno M., Nebbioso A., Galmozzi A., Mitro N., De Fabiani E., Altucci L., Kazantsev A., Study of 1,4-dihydropyridine structural scaffold: discovery of novel sirtuin activators and inhibitors. *J Med Chem*. 52(17): 5496-504 (2009)

Manson P., Report of a Case of Bilharzia from the West Indies. *Br Med J*. 2(2190): 1894-95 (1902)

Marek M., Kannan S., Hauser A.T., Moraes Mourão M., Caby S., Cura V., Stolfa D.A., Schmidtkunz K., Lancelot J., Andrade L., Renaud J.P., Oliveira G., Sippl W., Jung M., Cavarelli J., Pierce R.J., Romier C., Structural Basis for the Inhibition of Histone Deacetylase 8 (HDAC8), a Key Epigenetic Player in the Blood Fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog*. 9(9): e1003645 (2013)

Matilla A., Radrizzani M., The Anp32 family of proteins containing leucine-rich repeats. *Cerebellum*. 4(1): 7-18 (2005)

McCay C.M., Crowell M.F., Maynard L.A., The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate bodysize. *Nutrition*. 5(3): 155-71 (1935)

McCord R.A., Michishita E., Hong T., Berber E., Boxer L.D., Kusumoto R., Guan S., Shi X., Gozani O., Burlingame A.L., Bohr V.A., Chua K.F., SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging*. 1(1): 109-21 (2009)

McKinsey T.A., Zhang C.L., Lu J., Olson E.N., Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature*. 408(6808): 106-11 (2000)

McManus D.P., Loukas A., Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev*. 21(1): 225-42 (2008)

Mendel G., Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verh. Naturforsch. Ver. Brünn*. 4: 3-47 (1866)

Michishita E., Park J.Y., Burneskis J.M., Barrett J.C., Horikawa I., Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell*. 16(10): 4623-35 (2005)

Min J., Landry J., Sternglanz R., Xu R.M., Crystal structure of a SIR2 homolog-NAD complex. *Cell*. 105(2): 269-79 (2001)

Minsky N., Shema E., Field Y., Schuster M., Segal E., Oren M., Monoubiquitinated H2B is associated with the transcribed region of highly expressed genes in human cells. *Nat Cell Biol*. 10(4): 483-88 (2008)

Mohrmann L., Verrijzer C.P., Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim Biophys Acta*. 1681(2-3): 59-73 (2005)

Mostoslavsky R., Chua K.F., Lombard D.B., Pang W.W., Fischer M.R., Gellon L., Liu P., Mostoslavsky G., Franco S., Murphy M.M., Mills K.D., Patel P., Hsu J.T., Hong A.L., Ford E., Cheng H.L., Kennedy C., Nunez N., Bronson R., Frendewey D., Auerbach W., Valenzuela D., Karow M., Hottiger M.O., Hursting S., Barrett J.C., Guarente L., Mulligan R., Demple B., Yancopoulos G.D., Alt F.W., Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*. 124(2): 315-29 (2006)

Mujtaba S., Zeng L., Zhou M.M., Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene*. 26(37): 5521-27 (2007)

- N -

Nacif-Pimenta R., de Mattos A.C., Orfanó Ada S., Barbosa L., Pimenta P.F., Coelho P.M., *Schistosoma mansoni* in susceptible and resistant snail strains *Biomphalaria tenagophila*: in vivo tissue response and in vitro hemocyte interactions. *PLoS One*. 7(9): e45637 (2012)

Nakagawa T., Lomb D.J., Haigis M.C., Guarente L., SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell*. 137(3): 560-70 (2009)

Nakamura Y., Ogura M., Tanaka D., Inagaki N., Localization of mouse mitochondrial SIRT proteins: shift of SIRT3 to nucleus by co-expression with SIRT5. *Biochem Biophys Res Commun*. 366(1): 174-79 (2008)

Napper A.D., Hixon J., McDonagh T., Keavey K., Pons J.F., Barker J., Yau W.T., Amouzegh P., Flegg A., Hamelin E., Thomas R.J., Kates M., Jones S., Navia M.A., Saunders J.O.,

DiStefano P.S., Curtis R., Discovery of indoles as potent and selective inhibitors of the deacetylase SIRT1. *J Med Chem.* 48(25): 8045-54 (2005)

Narayan N., Lee I.H., Borenstein R., Sun J., Wong R., Tong G., Fergusson M.M., Liu J., Rovira I.I., Cheng H.L., Wang G., Gucek M., Lombard D., Alt F.W., Sack M.N., Murphy E., Cao L., Finkel T., The NAD-dependent deacetylase SIRT2 is required for programmed necrosis. *Nature.* 492(7428): 199-204 (2012)

Neugebauer R.C., Sippl W., Jung M., Inhibitors of NAD⁺ dependent histone deacetylases (sirtuins). *Curr Pharm Des.* 14(6): 562-73 (2008)

North B.J., Marshall B.L., Borra M.T., Denu J.M., Verdin E., The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell.* 11(2): 437-44 (2003)

North B.J., Verdin E., Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol.* 5(5): 224 (2004)

- O -

Oehme I., Deubzer H.E., Lodrini M., Milde T., Witt O., Targeting of HDAC8 and investigational inhibitors in neuroblastoma. *Expert Opin Investig Drugs.* 18(11): 1605-17 (2009)

Oger F., Dubois F., Caby S., Noël C., Cornette J., Bertin B., Capron M., Pierce R.J., The class I histone deacetylases of the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochem Biophys Res Commun.* 377(4): 1079-84 (2008)

Oliveira S.C., Fonseca C.T., Cardoso F.C., Farias L.P., Leite L.C., Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. *Acta Trop.* 108(2-3): 256-62 (2008)

Ohmae H., Sinuon M., Kirinoki M., Matsumoto J., Chigusa Y., Socheat D., Matsuda H., Schistosomiasis mekongi: from discovery to control. *Parasitol Int.* 53(2):135-42 (2004)

Onyango P., Celic I., McCaffery J.M., Boeke J.D., Feinberg A.P., SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(21): 13653-58 (2002)

Orecchia A., Scarponi C., Di Felice F., Cesarini E., Avitabile S., Mai A., Mauro M.L., Sirri V., Zambruno G., Albanesi C., Camilloni G., Failla C.M., Sirtinol treatment reduces inflammation in human dermal microvascular endothelial cells. *PLoS One.* 6(9): e24307 (2011)

Ouaissi M., Ouaissi A., Histone deacetylase enzymes as potential drug targets in cancer and parasitic diseases. *J Biomed Biotechnol.* 2006(2): 13474 (2006)

Outeiro T.F., Kontopoulos E., Altmann S.M., Kufareva I., Strathearn K.E., Amore A.M., Volk C.B., Maxwell M.M., Rochet J.C., McLean P.J., Young A.B., Abagyan R., Feany M.B., Hyman B.T., Kazantsev A.G., Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science.* 317(5837): 516-19 (2007)

- P -

- Pagans S., Pedal A., North B.J., Kaehlcke K., Marshall B.L., Dorr A., Hetzer-Egger C., Henklein P., Frye R., McBurney M.W., Hruby H., Jung M., Verdin E., Ott M., SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation. *PLoS Biol.* 3(2): e41 (2005)
- Palmer D.K., O'Day K., Wener M.H., Andrews B.S., Margolis R.L., A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J Cell Biol.* 104(4): 805-15 (1987)
- Parra M., Verdin E., Regulatory signal transduction pathways for class IIa histone deacetylases. *Curr Opin Pharmacol.* 10(4): 454-60 (2010)
- Pearson K.J., Baur J.A., Lewis K.N., Peshkin L., Price N.L., Labinsky N., Swindell W.R., Kamara D., Minor R.K., Perez E., Jamieson H.A., Zhang Y., Dunn S.R., Sharma K., Pleshko N., Woollett L.A., Csiszar A., Ikeno Y., Le Couteur D., Elliott P.J., Becker K.G., Navas P., Ingram D.K., Wolf N.S., Ungvari Z., Sinclair D.A., de Cabo R., Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab.* 8(2): 157-68 (2008)
- Peck B., Chen C.Y., Ho K.K., Di Fruscia P., Myatt S.S., Coombes R.C., Fuchter M.J., Hsiao C.D., Lam E.W., SIRT inhibitors induce cell death and p53 acetylation through targeting both SIRT1 and SIRT2. *Mol Cancer Ther.* 9(4): 844-55 (2010)
- Pehrson J.R., Fried V.A., MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science.* 257(5075): 1398-400 (1992)
- Perche P.Y., Robert-Nicoud M., Khochbin S., Vourc'h C., Nucleosome differentiation: role of histone H2A variants. *Med Sci.* 19(11): 1137-45 (2003)
- Pfaffl M.W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9): e45 (2001)
- Pham A.D., Sauer F., Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science.* 289: 2357-60 (2000)
- Picard F., Kurtev M., Chung N., Topark-Ngarm A., Senawong T., Machado De Oliveira R., Leid M., McBurney M.W., Guarente L., Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature.* 429(6993): 771-76 (2004)
- Pierce R.J., Dubois-Abdesselem F., Caby S., Trolet J., Lancelot J., Oger F., Bertheaume N., Roger E., Chromatin regulation in schistosomes and histone modifying enzymes as drug targets. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106(7): 794-801 (2011)
- Pierce R.J., Dubois-Abdesselem F., Lancelot J., Andrade L., Oliveira G., Targeting schistosome histone modifying enzymes for drug development. *Curr Pharm Des.* 18(24): 3567-78 (2012)
- Pifano F., Ron Pedrique M., The cercarial reaction of Vogel and Minning in the diagnosis of schistosomiasis mansoni. *Arch Venez Med Trop Parasitol Med.* 3: 185-92 (1959)
- Pinheiro C.S., Staub O., Mulvenna J., Loukas A., Jones M.K., Rabelo E.M., Characterization and binding affinities of SmLANP: a new *Schistosoma mansoni* member of the ANP32 family of regulatory proteins. *Mol Biochem Parasitol.* 165(2): 95-102 (2009)

Pointier J.P., The introduction of *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) to the island of Saint Lucia (West Indies) and its role in the decline of *Biomphalaria glabrata*, the snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* 54(1): 13-18 (1993)

Pointier J.P., Giboda M., The case for biological control of snail intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Today.* 15(10): 395-97 (1999)

Portela A., Esteller M., Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 28(10): 1057-68 (2010)

- Q -

Quack T., Knobloch J., Beckmann S., Vicogne J., Dissous C., Grevelding C.G., The formin-homology protein SmDia interacts with the Src kinase SmTK and the GTPase SmRho1 in the gonads of *Schistosoma mansoni*. *PLoS One.* 4(9): e6998 (2009)

- R -

Raddatz G., Guzzardo P.M., Olova N., Fantappiè M.R., Rampp M., Schaefer M., Reik W., Hannon G.J., Lyko F., Dnmt2-dependent methylomes lack defined DNA methylation patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(21): 8627-31 (2013)

Ramalho-Pinto F.J., Gazzinelli G., Howells R.E., Mota-Santos T.A., Figueiredo E.A., Pellegrino J. *Schistosoma mansoni* defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule in vitro. *Exp Parasitol.* 36(3): 360-72 (1974)

Rangasamy D., Tremethick D.J., Greaves I.K., Gene knockdown by ecdysone-based inducible RNAi in stable mammalian cell lines. *Nat Protoc.* 3(1): 79-88 (2008)

Ray-Gallet D., Quivy J.P., Scamps C., Martini E.M., Lipinski M., Almouzni G., HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol Cell.* 9(5): 1091-100 (2002)

Rea S., Eisenhaber F., O'Carroll D., Strahl B.D., Sun Z.W., Schmid M., Opravil S., Mechtler K., Ponting C.P., Allis C.D., Jenuwein T., Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature.* 406: 593-99 (2000)

Reichert N., Choukrallah M.A., Matthias P., Multiple roles of class I HDACs in proliferation, differentiation, and development. *Cell Mol Life Sci.* 69(13): 2173-87 (2012)

Ridgway P., Brown K.D., Rangasamy D., Svensson U., Tremethick D.J., Unique residues on the H2A.Z containing nucleosome surface are important for *Xenopus laevis* development. *Biol Chem.* 279(42): 43815-20 (2004)

Robzyk K., Recht J., Osley M.A., Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science.* 287(5452): 501-504 (2000)

Rodgers J.T., Lerin C., Haas W., Gygi S.P., Spiegelman B.M., Puigserver P., Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature.* 434(7029): 113-18 (2005)

Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S., Bonner W.M., DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 273(10): 5858-68 (1998)

Roll-Hansen N., Sources of Wilhelm Johannsen's genotype theory. *J Hist Biol.* 42(3): 457-93 (2009)

Rosa F.M., Marques D.P., Maciel E., Couto J.M., Negrão-Corrêa D.A., Teles H.M., Santos J.B., Coelho P.M., Breeding of *Biomphalaria tenagophila* in mass scale. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 55(1): 39-44 (2013)

Ross A.G., Bartley P.B., Sleigh A.C., Olds G.R., Li Y., Williams G.M., McManus D.P., Schistosomiasis. *N Engl J Med.* 346(16): 1212-20 (2002)

Ross A.G., Vickers D., Olds G.R., Shah S.M., McManus D.P., Katayama syndrome. *Lancet Infect Dis.* 7(3): 218-24 (2007)

Rossetto D., Avvakumov N., Côté J., Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics.* 7(10): 1098-108 (2012)

Rothgiesser K.M., Erener S., Waibel S., Lüscher B., Hottiger M.O., SIRT2 regulates NF- κ B dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310. *J Cell Sci.* 123: 4251-58 (2010)

Ruiz-Carrillo A., Wangh L.J., Allfrey V.G., Processing of newly synthesized histone molecules. *Science.* 190: 117-28 (1975)

Rundlett S.E., Carmen A.A., Kobayashi R., Bavykin S., Turner B.M., Grunstein M., HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(25): 14503-508 (1996)

- S -

Saha A., Wittmeyer J., Cairns B.R., Mechanisms for nucleosome movement by ATP-dependent chromatin remodeling complexes. *Results Probl Cell Differ.* 41: 127-48 (2006)

Sali A., Blundell T.L., Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* 234: 779-815, (1993)

Salter J.P., Lim K.C., Hansell E., Hsieh I., McKerrow J.H., Schistosome invasion of human skin and degradation of dermal elastin are mediated by a single serine protease. *J Biol Chem.* 275(49): 38667-73 (2000)

Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Unsal-Kacmaz K., Linn S., Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 73: 39-85 (2004)

Sanders B.D., Jackson B., Marmorstein R., Structural basis for sirtuin function: what we know and what we don't. *Biochim Biophys Acta.* 1804(8): 1604-16 (2010)

Saunders L.R., Verdin E., Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene.* 26(37): 5489-504 (2007)

- Sauve A.A., Schramm V.L., Sir2 regulation by nicotinamide results from switching between base exchange and deacetylation chemistry. *Biochemistry*. 42(31): 9249-56 (2003)
- Scher M.B., Vaquero A., Reinberg D., SirT3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes Dev*. 21(8): 920-28 (2007)
- Schiltz R.L., Mizzen C.A., Vassilev A., Cook R.G., Allis C.D., Nakatani Y., Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J Biol Chem*. 274:1189-92 (1999)
- Schistosoma japonicum Genome Sequencing and Functional Analysis Consortium. The Schistosoma japonicum genome reveals features of host-parasite interplay. *Nature*. 460(7253): 345-51 (2009)
- Schmeisser K., Mansfeld J., Kuhlowl D., Weimer S., Priebe S., Heiland I., Birringer M., Groth M., Segref A., Kanfi Y., Price N.L., Schmeisser S., Schuster S., Pfeiffer A.F., Guthke R., Platzer M., Hoppe T., Cohen H.Y., Zarse K., Sinclair D.A., Ristow M., Role of sirtuins in lifespan regulation is linked to methylation of nicotinamide. *Nat Chem Biol*. 9(11): 693-700 (2013)
- Schwer B., North B.J., Frye R.A., Ott M., Verdin E., The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol*. 158(4): 647-57 (2002)
- Sebastián C., Zwaans B.M., Silberman D.M., Gymrek M., Goren A., Zhong L., Ram O., Truelove J., Guimaraes A.R., Toiber D., Cosentino C., Greenson J.K., MacDonald A.I., McGlynn L., Maxwell F., Edwards J., Giacosa S., Guccione E., Weissleder R., Bernstein B.E., Regev A., Shiels P.G., Lombard D.B., Mostoslavsky R., The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell*. 151(6): 1185-99 (2012)
- Secor W.E., The effects of schistosomiasis on HIV/AIDS infection, progression and transmission. *Curr Opin HIV AIDS*. 7(3): 254-9 (2012)
- Segré C.V., Chiocca S., Regulating the regulators: the post-translational code of class I HDAC1 and HDAC2. *J Biomed Biotechnol*. 2011: 690848 (2011)
- Sereno D., Alegre A.M., Silvestre R., Vergnes B., Ouaiissi A., In vitro antileishmanial activity of nicotinamide. *Antimicrob Agents Chemothe*. 49(2): 808-12 (2005)
- Seyedin S.M., Kistler W.S., Isolation and characterization of rat testis H1t. An H1 histone variant associated with spermatogenesis. *J Biol Chem*. 255(12): 5949-54 (1980)
- Sharma A., Gautam V., Costantini S., Paladino A., Colonna G., Interactomic and pharmacological insights on human sirt-1. *Front Pharmacol*. 3: 40 (2012)
- Sharma M., Zarnegar M., Li X., Lim B., Sun Z., Androgen receptor interacts with a novel MYST protein, HBO1. *J Biol Chem*. 275: 35200-208 (2000)
- Sherman J.M., Stone E.M., Freeman-Cook L.L., Brachmann C.B., Boeke J.D., Pillus L., The conserved core of a human SIR2 homologue functions in yeast silencing. *Mol Biol Cell*. 10(9): 3045-59 (1999)

- Shi T., Wang F., Stieren E., Tong Q., SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Biol Chem.* 280(14): 13560-567 (2005)
- Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstine J.R., Cole P.A., Casero R.A., Shi Y., Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* 119(7): 941-53 (2004)
- Shore D., Squire M., Nasmyth K.A., Characterization of two genes required for the position-effect control of yeast mating-type genes. *EMBO J.* 3(12): 2817-23 (1984)
- Shuhua X., Jiqing Y., Jinying M., Huifang G., Peiyong J., Tanner M., Effect of praziquantel together with artemether on *Schistosoma japonicum* parasites of different ages in rabbits. *Parasitol Int.* 49(1): 25-30 (2000)
- Sierra J., Yoshida T., Joazeiro C.A., Jones K.A., The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes Dev.* 20: 586-600 (2006)
- Smith B.C., Denu J.M., Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochim Biophys Acta.* 1789(1): 45-57 (2009)
- Smith B.C., Denu J.M., Sir2 protein deacetylases: evidence for chemical intermediates and functions of a conserved histidine. *Biochemistry.* 45(1): 272-82 (2006)
- Smith E.R., Belote J.M., Schiltz R.L., Yang X.J., Moore P.A., Berger S.L., Nakatani Y., Allis C.D., Cloning of Drosophila GCN5: conserved features among metazoan GCN5 family members. *Nucleic Acids Res.* 26(12): 2948-54 (1998)
- Smith J.J., Kenney R.D., Gagne D.J., Frushour B.P., Ladd W., Galonek H.L., Israelian K., Song J., Razvadauskaite G., Lynch A.V., Carney D.P., Johnson R.J., Lavu S., Iffland A., Elliott P.J., Lambert P.D., Elliston K.O., Jirousek M.R., Milne J.C., Boss O., Small molecule activators of SIRT1 replicate signaling pathways triggered by calorie restriction in vivo. *BMC Syst Biol.* 3: 31 (2009)
- Smith S., Stillman B., Stepwise assembly of chromatin during DNA replication in vitro. *EMBO J.* 10(4): 971-80 (1991)
- Smithers S.R., Terry R.J., The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology.* 55: 695-700 (1965)
- Souza P.P., Santos D.N., Pena S.D., Franco G.R., Cloning and molecular characterization of the *Schistosoma mansoni* genes RbAp48 and histone H4. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97(1): 77-84 (2002)
- Steinmann P., Keiser J., Bos R., Tanner M., Utzinger J., Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis.* 6(7): 411-25 (2006)
- Sterner D.E., Berger S.L., Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64(2): 435-59 (2000)

Sudarsanam P., Iyer V.R., Brown P.O., Winston F., Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(7): 3364-69 (2000)

Sun Y., Jiang X., Chen S., Fernandes N., Price B.D., A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 13182-187 (2005)

Suto R.K., Clarkson M.J., Tremethick D.J., Luger K., Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol*. 7(12): 1121-24 (2000)

Sutton W.S., The chromosomes in heredity. *Biol. Bull.* 4: 231-251 (1903)

Sykes S.M., Mellert H.S., Holbert M.A., Li K., Marmorstein R., Lane W.S., McMahon S.B., Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell*. 24(6): 841-51 (2006)

- T -

Tanaka H., Tsuji M., From discovery to eradication of schistosomiasis in Japan: 1847-1996. *Int J Parasitol*. 27(12): 1465-80 (1997)

Tang L., Nogales E., Ciferri C., Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. *Prog Biophys Mol Biol*. 102(2-3): 122-28 (2010)

Tendler M., Simpson A.J., The biotechnology-value chain: development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. *Acta Trop*. 108(2-3): 263-66 (2008)

Tervo A.J., Kyrlylenko S., Niskanen P., Salminen A., Leppänen J., Nyrönen T.H., Järvinen T., Poso A., An in silico approach to discovering novel inhibitors of human sirtuin type 2. *J Med Chem*. 47(25): 6292-98 (2004)

Thomas H., Gönner R., The efficacy of praziquantel against cestodes in animals. *Z Parasitenkd*. 52(2): 117-27 (1977)

Tissenbaum H.A., Guarente L., Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 410(6825): 227-30 (2001)

Tochio N., Umehara T., Munemasa Y., Suzuki T., Sato S., Tsuda K., Koshihara S., Kigawa T., Nagai R., Yokoyama S., Solution structure of histone chaperone ANP32B: interaction with core histones H3-H4 through its acidic concave domain. *J Mol Biol*. 401(1): 97-114 (2010)

Tran M.H., Pearson M.S., Bethony J.M., Smyth D.J., Jones M.K., Duke M., Don T.A., McManus D.P., Correa-Oliveira R., Loukas A., Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat Med*. 12(7): 835-40 (2006)

Tsai Y.C., Greco T.M., Cristea I.M., SIRT7 plays a role in ribosome biogenesis and protein synthesis. *Mol Cell Proteomics*. (2013)

Tse C., Georgieva E.I., Ruiz-García A.B., Sendra R., Hansen J.C., Gcn5p, a transcription-related histone acetyltransferase, acetylates nucleosomes and folded nucleosomal arrays in the absence of other protein subunits. *J Biol Chem.* 273(49): 32388-392 (1998)

Tsukada Y., Fang J., Erdjument-Bromage H., Warren M.E., Borchers C.H., Tempst P., Zhang Y., Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature.* 439: 811-816 (2006)

Tsukiyama T., Wu C., Chromatin remodeling and transcription. *Curr Opin Genet Dev.* 7(2): 182-91 (1997)

- U -

Uciechowska U., Schemies J., Neugebauer R.C., Huda E.M., Schmitt M.L., Meier R., Verdin E., Jung M., Sippl W., Thiobarbiturates as sirtuin inhibitors: virtual screening, free-energy calculations, and biological testing. *ChemMedChem.* 3(12): 1965-76 (2008)

Utley R.T., Cote J., The MYST family of histone acetyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol.* 274: 202-36 (2003)

- V -

Van Hooser A.A., Ouspenski I.I., Gregson H.C., Starr D.A., Yen T.J., Goldberg M.L., Yokomori K., Earnshaw W.C., Sullivan K.F., Brinkley B.R., Specification of kinetochore-forming chromatin by the histone H3 variant CENP-A. *J Cell Sci.* 114(19): 3529-42 (2001)

Van Meter M., Mao Z., Gorbunova V., Seluanov A., SIRT6 overexpression induces massive apoptosis in cancer cells but not in normal cells. *Cell Cycle.* 10(18): 3153-58 (2011)

Vanderstraete M, Gouignard N, Cailliau K, Morel M, Lancelot J, Bodart JF, Dissous C. Dual targeting of insulin and venus kinase Receptors of *Schistosoma mansoni* for novel anti-schistosome therapy. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(5): e2226 (2013)

Vaquero A., Loyola A., Reinberg D., The constantly changing face of chromatin. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2003(14): RE4 (2003)

Vaquero A., Scher M.B., Lee D.H., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Reinberg D., Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell.* 16(1): 93-105 (2004)

Vaquero A., Scher M.B., Lee D.H., Sutton A., Cheng H.L., Alt F.W., Serrano L., Sternglanz R., Reinberg D., SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev.* 20(10): 1256-61 (2006)

Varga-Weisz P.D., Wilm M., Bonte E., Dumas K., Mann M., Becker P.B., Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature.* 388(6642): 598-602 (1997)

Vaziri H., Dessain S.K., Ng Eaton E., Imai S.I., Frye R.A., Pandita T.K., Guarente L., Weinberg R.A., hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell.* 107(2): 149-59 (2001)

Vergnes B., Sereno D., Tavares J., Cordeiro-da-Silva A., Vanhille L., Madjidian-Sereno N., Depoix D., Monte-Alegre A., Ouaiissi A., Targeted disruption of cytosolic SIR2 deacetylase discloses its essential role in Leishmania survival and proliferation. *Gene*. 363: 85-96 (2005)

Vergnes B., Vanhille L., Ouaiissi A., Sereno D., Stage-specific antileishmanial activity of an inhibitor of SIR2 histone deacetylase. *Acta Trop*. 94(2): 107-15 (2005)

Vignali M., Hassan A.H., Neely K.E., Workman J.L., ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol*. 20(6): 1899-910 (2000)

Villalba J.M., Alcaín F.J., Sirtuin activators and inhibitors. *Biofactors*. 38(5): 349-59 (2012)

- W -

Waltregny D., Glénisson W., Tran S.L., North B.J., Verdin E., Colige A., Castronovo V., Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle alpha-actin and is essential for smooth muscle cell contractility. *FASEB J*. 19(8): 966-68 (2005)

Wang H., Cheng F., Woan K., Sahakian E., Merino O., Rock-Klotz J., Vicente-Suarez I., Pinilla-Ibarz J., Wright K.L., Seto E., Bhalla K., Villagra A., Sotomayor E.M., Histone deacetylase inhibitor LAQ824 augments inflammatory responses in macrophages through transcriptional regulation of IL-10. *J Immunol*. 186(7): 3986-96 (2011)

Watson J.D., Crick F.H.C., A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 171: 737-738 (1953)

Webster B.L., Southgate V.R., Littlewood D.T., A revision of the interrelationships of Schistosoma including the recently described Schistosoma guineensis. *Int J Parasitol*. 36(8): 947-55 (2006)

Wei Y., Mizzen C.A., Cook R.G., Gorovsky M.A., Allis C.D., Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(13): 7480-84 (1998)

West M.H., Bonner W.M., Histone 2B can be modified by the attachment of ubiquitin. *Nucleic Acids Res*. 8(20): 4671-80 (1980)

Wheater P.R., Wilson R.A., Schistosoma mansoni: a histological study of migration in the laboratory mouse. *Parasitology*. 79(1): 49-62 (1979)

Wilson B.G., Roberts C.W., SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat Rev Cancer*. 11(7): 481-92 (2011)

Wilson R.A., Draskau T., Miller P., Lawson J.R., Schistosoma mansoni: the activity and development of the schistosomulum during migration from the skin to the hepatic portal system. *Parasitology*. 77(1): 57-73 (1978)

Wolf E., Vassilev A., Makino Y., Sali A., Nakatani Y., Burley S.K., Crystal structure of a GCN5-related N-acetyltransferase: Serratia marcescens aminoglycoside 3-N-acetyltransferase. *Cell*. 94(4): 439-49 (1998)

Wood A., Krogan N.J., Dover J., Schneider J., Heidt J., Boateng M.A., Dean K., Golshani A., Zhang Y., Greenblatt J.F., Johnston M., Shilatifard A., Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell*. 11(1): 267-74 (2003)

Wood J.G., Rogina B., Lavu S., Howitz K., Helfand S.L., Tatar M., Sinclair D., Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*. 431(7004): 107 (2004)

- X -

Xiao S., Shi Z., Zhuo S., Wang C., Zhang Z., Chu B., Zhen J., Chen M., Field studies on the preventive effect of oral artemether against schistosomal infection. *Chin Med J (Engl)*. 109(4): 272-75 (1996)

Xu W., Edmondson D.G., Roth S.Y., Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates. *Mol Cell Biol*. 18(10): 5659-69 (1998)

- Y -

Yamauchi Y., Boukari H., Banerjee I., Sbalzarini I.F., Horvath P., Helenius A., Histone deacetylase 8 is required for centrosome cohesion and influenza A virus entry. *PLoS Pathog*. 7(10): e1002316 (2011)

Yeung F., Hoberg J.E., Ramsey C.S., Keller M.D., Jones D.R., Frye R.A., Mayo M.W., Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*. 23(12): 2369-80 (2004)

Yoda K., Ando S., Morishita S., Houmura K., Hashimoto K., Takeyasu K., Okazaki T., Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(13): 7266-71 (2000)

Yoshino T.P., Laursen J.R., (1995) Production of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts from mother sporocysts maintained in synxenic culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cells. *J Parasitol*. 81: 714-22 (1995)

Young N.D., Jex A.R., Li B., Liu S., Yang L., Xiong Z., Li Y., Cantacessi C., Hall R.S., Xu X., Chen F., Wu X., Zerlotini A., Oliveira G., Hofmann A., Zhang G., Fang X., Kang Y., Campbell B.E., Loukas A., Ranganathan S., Rollinson D., Rinaldi G., Brindley P.J., Yang H., Wang J., Wang J., Gasser R.B., Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. *Nat Genet*. 44(2): 221-25 (2012)

Yuan C., Fu Y.J., Li J., Yue Y.F., Cai L.L., Xiao W.J., Chen J.P., Yang L., *Schistosoma japonicum*: efficient and rapid purification of the tetraspanin extracellular loop 2, a potential protective antigen against schistosomiasis in mammalian. *Exp Parasitol*. 126(4): 456-61 (2010)

- Z -

Zaghloul M.S., Bladder cancer and schistosomiasis. *J Egypt Natl Canc Inst*. 24(4): 151-9 (2012)

- Zhang W., Ahmad G., Torben W., Noor Z., Le L., Damian R.T., Wolf R.F., White G.L., Chavez-Suarez M., Podesta R.B., Kennedy R.C., Siddiqui A.A., Sm-p80-based DNA vaccine provides baboons with levels of protection against *Schistosoma mansoni* infection comparable to those achieved by the irradiated cercarial vaccine. *J Infect Dis.* 201(7): 1105-12 (2010)
- Zhang Y., Au Q., Zhang M., Barber J.R., Ng S.C., Zhang B., Identification of a small molecule SIRT2 inhibitor with selective tumorcytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 386(4): 729-33 (2009)
- Zhang Y., Ng H.H., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Bird A., Reinberg D., Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase corecomplex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev.* 13(15): 1924-35 (1999)
- Zhang Y., Reinberg D., Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15(18): 2343-60 (2001)
- Zhao W., Kruse J.P., Tang Y., Jung S.Y., Qin J., Gu W., Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature.* 451(7178): 587-90 (2008)
- Zhao X., Sternsdorf T., Bolger T.A., Evans R.M., Yao T.P., Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4 and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. *Mol Cell Biol.* 25(19): 8456-64 (2005)
- Zhong L., D'Urso A., Toiber D., Sebastian C., Henry R.E., Vadysirisack D.D., Guimaraes A., Marinelli B., Wikstrom J.D., Nir T., Clish C.B., Vaitheesvaran B., Iliopoulos O., Kurland I., Dor Y., Weissleder R., Shiriha O.S., Ellisen L.W., Espinosa J.M., Mostoslavsky R., The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha. *Cell.* 140(2): 280-93 (2010)
- Zhu Q., Pao G.M., Huynh A.M., Suh H., Tonnu N., Nederlof P.M., Gage F.H., Verma I.M. BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. *Nature.* 477(7363): 179-84 (2011)