

UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE

École Doctorale Biologie-Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR en Biologie Santé de l'Université Lille Nord de France

Spécialité : Parasitologie

Présentée et soutenue publiquement par

Thomas Mouveaux

Sous la direction de

Mathieu GISSOT

Le 13/12/2023

**Etude des mécanismes de régulation des gènes au cours de la
différenciation entre les formes tachyzoïte et bradyzoïte du parasite
*Toxoplasma gondii***

Composition du jury :

Monsieur le Professeur Allouat El Moukhtar, Président du jury

Monsieur le Docteur Sébastien Besteiro, Université de Montpellier, Rapporteur

Madame le Docteur Corinne Loeuillet, Université de Grenoble, Rapporteur

Madame le Docteur Françoise Dubuisson, Institut de Biologie de Lille, Examineur

Monsieur le Docteur Mathieu Gissot, Directeur de thèse

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Institut Pasteur de Lille

Équipe 2 - Biologie des parasites Apicomplexes

INSERM U1019 - CNRS UMR 8204 - Université de Lille

1, rue du Professeur Calmette 59019 Lille Cedex, France

« La femme est l'avenir de l'homme »
Louis Aragon
Le Fou d'Elsa (1963)

*Aux femmes qui m'ont aimé,
Et qui ont fait de moi celui que je suis,*

A ma mère

A ma femme,

A ma fille.

Remerciements

Je remercie l'Institut Pasteur de Lille et le Centre d'Infection et d'Immunité de Lille pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de l'équipe de Biologie des Parasites Apicomplexes dirigée par le Docteur Jamal Khalife.

Je remercie également l'ensemble des membres de mon jury de thèse : le Professeur El Moukhtar Aliouat pour la présidence du jury, les Docteurs Corinne Loeuillet et Sébastien Besteiro qui ont accepté de juger mon travail en étant rapporteurs de ma thèse et le Docteur Françoise Dubuisson pour le temps qu'elle a accordé à l'examen de ce manuscrit.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Mathieu Gissot qui m'a proposé cette thèse, qui m'a soutenu quand les moments se sont montrés difficiles et m'a encadré avec la bienveillance managériale qui le caractérise. Nous travaillons au sein du même laboratoire depuis 15 ans, je suis sous son autorité depuis maintenant 8 ans, et Mathieu a réussi le tour de force de me supporter et me manager sans que jamais je ne le considère comme un chef pénible ou autoritaire. Comme le dit la chanson : « C'est mon ami et c'est mon maître, c'est mon maître et c'est mon ami » (Mon ami, mon maître ; Serge Lama). Merci pour ton enseignement, merci pour ta bienveillance, merci d'être toi.

Au sein de ce laboratoire en 15 années de recherche, j'ai connu des moments difficiles et oppressants les premières années qui ont laissé place à des moments de joies et de partage avec des personnes formidables. Être bien entouré est primordial pour faire de la bonne science. Je tiens donc à remercier chaleureusement les personnes compétentes, bienveillantes et pleines d'humour constituant notre équipe actuelle dans laquelle je m'épanouis et j'ai plaisir à échanger. Christine toujours là pour organiser les projets et se payer une bonne tranche de rire, Caroline notre pâtissière d'élite sans qui tout serait plus compliqué, El Moukhtar mon altère égaux des One-man-shows improvisés, Sabrina notre rêveuse stratosphérique, Véronique la cavalière ésotérique, Manu l'insaisissable, Jamal le patriarche Khalife à la place du calife, et nos étudiants, post-docs et contractuels Tom, Camille, Floriane, Maanassa, Hala, Lola, Anaïs, Claudianne, Marcin, Justine et tant d'autres que j'ai contribué à former et qui m'ont tant apporté durant ces années. Je n'oublie pas Kévin qui nous a quittés pour combattre le crime à grands coups de pipettes et d'écouvillons, toujours prêt pour soulever de la fonte ou abattre un mur. Bref merci à chaque personne que je côtoie ou ai côtoyé professionnellement, vous faites partie de moi.

Au-delà d'une vie professionnelle épanouie, j'ai la chance d'avoir une vie familiale heureuse. Je remercie ceux qui rendent ça possible et me donne la force d'avancer au quotidien. Tout d'abord celle qui me soutient quand je flanche, qui m'aime quand je me déteste et me comprend d'un simple regard : Elise, ma femme chérie, la mère de mes enfants. Mais également un grand merci à Lola, Noé et Isaac, mes enfants, mes trésors, ma priorité, mes plus belles réussites. Je remercie également mon père qui m'a tant appris et tant donné, qui m'aide quotidiennement dans mes projets de rénovation immobilière et m'a permis de me délester de beaucoup de contraintes, de stress et de me concentrer (un peu) sur ma thèse.

Résumé

Toxoplasma gondii est un parasite appartenant au phylum des Apicomplexes et responsable de la toxoplasmose chez l'Homme. La différenciation d'une forme répliquative appelée tachyzoïte à une forme enkystée appelée bradyzoïte, est essentielle pour sa persistance chez l'hôte intermédiaire et pour sa transmission. Cette étape permet d'assurer la survie du parasite et d'échapper au système immunitaire. Aucun traitement ne permet à ce jour de traiter la forme chronique de la maladie ou d'éliminer les kystes parasitaires présents au sein du cerveau, des yeux et des muscles des patients infectés. La conversion d'une forme à une autre est une étape clef pour la pathogénèse du parasite et est marquée par des modifications métaboliques et changements d'expressions géniques. Les mécanismes impliqués dans ces transitions sont encore peu caractérisés, et apparaissent de plus en plus comme de futures cibles potentielles thérapeutiques dans la lutte contre cette parasitose.

Nous avons tenté de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui contrôlent la différenciation chez *T. gondii*. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'implication des enzymes modificatrices de la chromatine dans la régulation des gènes au cours de la différenciation. Notamment, nous avons utilisé des inhibiteurs de l'activité Histone Déacétylase (HDAC) chez le parasite afin de mieux comprendre leur rôle et leur essentialité dans ce processus. Nous explorons ici l'efficacité d'un inhibiteur d'HDAC (MC1742) sur la forme tachyzoïte perturbant profondément l'expression des gènes et induisant la mort du parasite. Nous démontrons l'implication des Histones Déacétylases dans les mécanismes de changement de formes parasitaires, et vérifions l'importance de la régulation épigénétique dans les processus de conversion de *T. gondii*. Nous avons aussi étudié la conversion parasitaire du tachyzoïte vers le bradyzoïte grâce à l'élaboration d'un nouvel outil de culture cellulaire permettant d'obtenir des bradyzoïtes matures dans des cellules cérébrales. Nos travaux mettent en évidence les diverses vagues de changements successives de profil d'expression des gènes qui s'opèrent au cours de la conversion, spontanée au sein des cellules cérébrales, tachyzoïte-bradyzoïte au long cours (plus de 2 semaines).

Abstract

Toxoplasma gondii is a parasite of the Apicomplexa phylum that causes toxoplasmosis in humans. Technical term abbreviations will be explained upon first use. Differentiation from the replicative tachyzoite stage to the encysted bradyzoite stage is crucial for persistence in the intermediate host and transmission. This stage allows the parasite to evade the immune system and survive. To date, there is no treatment available for the chronic form of the disease or the parasitic cysts present in the brain, eyes, and muscles of infected patients. Conversion between different forms represents a major stage in the pathogenesis of the parasite, characterized by metabolic modifications and changes in gene expression. The mechanisms responsible for these transitions remain poorly understood, but they are increasingly recognized as possible therapeutic targets for coping with this parasitic infection.

We aimed to gain a better understanding of the molecular mechanisms that control differentiation in *T. gondii*. To achieve this, we investigated the involvement of chromatin-modifying enzymes in gene regulation during differentiation. Specifically, we utilized inhibitors of Histone Deacetylase (HDAC) activity in the parasite to gain insight into their role and importance in this process. Here, we investigate the effectiveness of the HDAC inhibitor (MC1742) on the tachyzoite form, which drastically impacts gene expression and promotes parasite death. We establish the role of Histone Deacetylase in parasite shape-changing mechanisms and confirm the significance of epigenetic regulation in *T. gondii* transformation processes. Additionally, we investigate the transformation of parasites from tachyzoite to bradyzoite by developing a novel cell culture apparatus that enables mature bradyzoites to be obtained within brain cells. Our study reveals the multiple waves of alterations in gene expression profiles that transpire over a period exceeding two weeks during the spontaneous conversion of tachyzoites to bradyzoites in brain cells.

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	4
Abstract	5
Table des matières	6
Abréviations :	9
Introduction	12
1 Toxoplasma gondii : Classification et cycle de vie	12
1.1 Historique et classification	12
1.2 Les apicomplexes	13
1.2.1 Le paludisme	13
1.2.2 La babesiose	14
1.2.3 La néosporose	14
1.2.4 La cryptosporidiose	14
1.2.5 Les coccidioses	14
1.3 Le toxoplasme : un cycle de vie complexe et une répartition globale	15
1.3.1 Trois types prédominants	15
1.3.2 Un cycle de vie complexe	16
1.3.3 La phase sexuée :	17
1.3.4 La phase asexuée :	17
2 La toxoplasmose, prophylaxie et traitement	19
2.1 La toxoplasmose humaine	19
2.1.1 Toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent	20
2.1.2 La toxoplasmose congénitale	20
2.1.3 La toxoplasmose du sujet immunodéprimé	21
2.1.3.1 La toxoplasmose cérébrale	21
2.1.3.2 La toxoplasmose oculaire	22
2.1.3.3 La toxoplasmose pulmonaire	23
2.1.4 Données épidémiologiques	23
2.1.5 Le diagnostic	24
2.2 Prophylaxies, traitements et nouvelles voix thérapeutiques	25
2.2.1 Thérapeutiques conventionnelles	25
2.2.1.1 La voie de synthèse des folates :	25
2.2.1.2 La voie de synthèse de l'apicoplaste	25
2.2.1.3 La voie de l'ubiquinone dans la mitochondrie	26
2.2.2 Nouvelles cibles thérapeutiques et perspectives	27
2.2.2.1 Détournement de molécules pharmaceutiques	28
2.2.2.2 Principales cibles thérapeutiques potentielles	28
2.2.2.2.1 La voie de synthèse des folates et inhibiteurs de la chaîne de transport d'électrons	28
2.2.2.2.2 La perturbation de l'apicoplaste	29

2.2.2.2.3	Perturbation de la motilité du parasite	29
2.2.2.2.4	Perturbation de l'interconversion tachyzoïte-bradyzoïte	29
2.2.2.2.5	La perturbation de l'acétylation d'histones.....	30
2.2.2.2.5.1	Les inhibiteurs d'histones déacétylases (iHDAC) :.....	31
2.2.2.2.5.2	Inhibiteurs des histones acétyl-transférase (HATs) :.....	33
2.2.2.2.5.3	Inhibiteurs des bromodomaines :	36
3	Ultrastructure, cycle cellulaire et régulation des gènes chez T. gondii	37
3.1	Ultrastructure et organelles.....	37
3.1.1	Ultrastructure du tachyzoïte	37
3.1.1.1	Le cytosquelette cortical	37
3.1.1.1.1	La pellicule	37
3.1.1.1.2	Le conoïde et le réseau microtubulaire	40
3.1.2	Les organites spécifiques	41
3.1.2.1	L'apicoplaste	41
3.1.2.2	Les organites sécrétoires :	42
3.1.3	Le cycle lytique	42
3.2	Cycle cellulaire et réplication du parasite	43
3.2.1	Un cycle cellulaire inhabituel.....	43
3.3	La transcription	45
3.3.1.1	La transcription chez Toxoplasma.....	45
3.3.1.2	Les facteurs de transcription chez T. gondii.....	47
3.4	Le remodelage et les modifications de la chromatine chez Toxoplasma :.....	48
3.4.1	Les histones:	49
3.4.1.1	L'acétylation des histones :.....	49
3.4.1.2	La méthylation des histones	51
3.4.1.3	L'ubiquitination des histones	52
3.4.1.4	Autres modifications post-traductionnelles et association de diverses modifications au sein du nucléosome	53
3.4.1.4.1	La succinylation	53
3.4.1.4.2	La formylation.....	53
3.4.1.4.3	La propionylation.....	53
3.4.1.4.4	La crotonylation.....	53
3.4.1.5	Les variants d'histones.....	54
4	L'interconversion ou la clef d'une pathogénicité complexe :	56
4.1	Structure du bradyzoïte :	56
4.1.1	Apparition de la paroi kystique :.....	56
4.1.2	Le métabolisme du bradyzoïte	57
4.2	Modèle d'étude du bradyzoïte :	58
4.2.1	La génération de bradyzoïtes in vitro :	58
4.3	Déterminants de l'environnement cellulaire propice au développement spontané des bradyzoïtes.....	62
4.4	L'expression différentielle entre le tachyzoïte et le bradyzoïte :.....	62
4.4.1	La régulation et les facteurs transcriptionnels dans le bradyzoïte	63
4.4.2	L'importance du contrôle traductionnel dans l'initiation de changement de stade parasitaire ...	64
4.4.3	L'importance du cycle cellulaire dans l'initiation de la différenciation	65
4.4.4	Implication de la régulation épigénétique dans la conversion tachyzoïte-bradyzoïte :.....	65
	Problématique :	68
	Résultats :.....	69

5	A potent HDAC inhibitor blocks <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoite growth and profoundly disrupts parasite gene expression.....	69
5.1	Introduction	69
5.2	Publication	70
5.3	Résultats complémentaires :.....	81
5.3.1	Identification de la ou des cibles de MC1742 :	81
5.3.1.1	Approche par étude structurale et bibliographique	81
6	Primary brain cell infection by <i>Toxoplasma gondii</i> reveals the extent and dynamics of parasite differentiation and its impact on neuron biology.....	87
6.1	Introduction	87
6.2	Publication	88
6.3	Résultats complémentaires :.....	111
6.3.1	Mise au point des conditions nécessaires à une infection par <i>T. gondii</i> de cellules cérébrales en microfluidique sur une durée de 14 jours	111
	<i>Discussion</i>	114
7	Etude de la conversion tachyzoïte-bradyzoïte.....	114
8	La réplication du bradyzoïte	121
9	Bradyzoïte et invasion	122
10	Les inhibiteurs d'HDAC, entre outils d'études fondamentales et potentiels futurs composés thérapeutiques	123
	<i>Perspectives</i> :	127
	<i>Bibliographie</i>	128

Abréviations :

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ApiAP2	Apicomplexan APetela-2
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ARNr	Acide RiboNucléique ribosomique
BAG	Bradyzoïte AntiGene
BFD1	Bradyzoïte Factor Differentiation
BRP	BRadyzoite Pseudokinase
CAS9	CRISPR Associated Protein 9
CE50-EC50	Concentration Efficace 50%
CI50-IC50	Concentration Inhibitrice 50%
CRISPER	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CST	Cyst wall protein
DAPI	Di Aminido Phenyl Indol
DBA	DolichosBiflorus Agglutinine
DEG	Differentially Expressed Genes
DHPS	DiHydroPtéroate Synthétase
DHFR	DiHydroFolate Réductase
DHOD	DiHydroOrotate Déshydrogénase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTT	DiThioThréitol
eIF2	eukaryotic Initiation Factor 2
ENO	Enolase
FT	Facteur de Transcription
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	GlycosylPhosphatidyl Inositol
GRA	GRAnule dense protein

GTP	Guanosine TriPhosphate
H	Histone
HAART	Highly active antiretroviraltherapy
HAT	Histone Acétyl-Transferase
HDAC	Histone DéACétylase
HFF	Human Foreskin Fibroblast
IFA	ImmunoFluorescence Assay
Ig	Immunoglobulin
iHDAC	Inhibiteur d'HDAC
IMC	Inner Membrane Complex
INF- γ	Interféron Gamma
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
ISR	Integrated Response Stress (réponse intégrée au stress)
J1-14	Jour 1-14
KO	Knock-Out
LDH	Lactate DeHydrogenase
MAG	Matrix AntiGene
MOI	Multiplicity Of Infection
MORC	MicrORChidia
MPT	Modification Post-Traductionnelle
MYB	MYeloBlastose Family
NF3	Facteur Nucléaire 3
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OR	Odd-Ratio
PAF	PAraFormaldéhyde
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RE	Réticulum Endoplasmique
RNA-Seq	Séquençage d'ARN
RON	RhOptry Neck protein

ROP	RhOpry Protein
RS	Score de Résistance
RT	Reverse Transcriptase
SAG	Surface Antigen
SKMS	Skeletal Muscle Cells
SIDA	Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
SRS	SAG1 Related Sequences
SVF	Sérum de Veau Foetal
TBS	Tris Buffered Saline
TSPYL	Testis Specific Protein Y-Linked
Turbo-ID	Turbo IDentification
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VP	Vacuole Parasitophore
WB	Western Blot

Introduction.

1 *Toxoplasma gondii* : Classification et cycle de vie

1.1 Historique et classification

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) est un protozoaire appartenant au phylum des *Apicomplexes* responsable de la toxoplasmose (tableau 1). Ce parasite a été décrit pour la première fois en 1908 à l'Institut Pasteur de Tunis (Tunisie) par Nicolle et Manceaux dans les tissus d'un rongeur sauvage, le *gundi* (*Ctenodactylus gundi*). Nicolle et Manceaux ont d'abord cru identifier un parasite du genre *Leishmania*, qu'ils nommèrent *Leishmania gondii* avant de lui donner le nom de *Toxoplasma gondii* en rapport avec sa forme arquée (du grec *Toxon* signifiant *arc*) et de l'hôte dans lequel il a été découvert (*gondii*). Il est découvert chez l'Homme par Darling la même année et retrouvé en 1923 par Janku dans des kystes rétiniens d'un enfant atteint d'hydrocéphalie. La mise au point de tests de diagnostics sérologiques dans les années 40 a permis de révéler sa grande prévalence.

Seul représentant connu de son espèce, *T. gondii* est un parasite intracellulaire obligatoire d'organismes homéothermes et partage des caractéristiques biologiques et constitutives spécifiques et communes avec les autres espèces appartenant au même phylum :

- Le complexe apical qui a donné le nom aux Apicomplexes est constitué de 3 organites sécrétoires (les rhoptries, les micronèmes et les granules denses). Cette machinerie est essentielle à l'invasion de la cellule hôte. La décharge séquentielle de son contenu participe à la formation de la jonction mobile, essentielle à l'invasion des cellules hôtes, et de la vacuole parasitophore, compartiment membranaire dans lequel le parasite proliférera.
- Les éléments et l'organisation du cytosquelette dont le conoïde et l'anneau polaire dans la région apicale (1).
- La plupart des Apicomplexes présentent 2 organites possédant leur propre matériel génétique extranucléaire, la mitochondrie (excepté pour *Cryptosporidium*) et l'Apicoplaste qui résulte de l'internalisation d'un plaste vestigial au cours de l'évolution.

Certains Apicomplexes sont des pathogènes humains ou vétérinaires. *Toxoplasma gondii* est responsable de la parasitose la plus répandue à l'échelle du globe : la Toxoplasmose.

Domaine	<i>Eukaryota</i>	
Règne	<i>Alveolata</i>	décrit par Cavalier-Smith en 1991
Embranchement	<i>Apicomplexa</i>	décrit par Levine en 1970
Classe	<i>Coccidia</i>	décrit par Leuckart en 1879
Ordre	<i>Eucoccidiorida</i>	décrit par Léger et Duboscq en 1910
Famille	<i>Sarcocystidae</i>	décrit par Poche en 1913
Genre	<i>Toxoplasma</i>	décrit par Nicolle et Manceaux en 1909
Espèce	<i>gondii</i>	décrit par Nicolle et Manceaux en 1908

Tableau 1. Classification taxonomique du parasite *Toxoplasma gondii*.

1.2 Les apicomplexes

La classification des organismes eucaryotes repose aujourd'hui sur une organisation basée sur l'évolution. La diversité de l'ADN mitochondrial a permis cette classification (2). Ainsi, les eucaryotes ont été classés en 6 grands groupes : les Opisthokonta, les Amoebozoa, les Excavata, les Rhizaria, les Archaeplastida et les Chromalveolata (2,3). Les Alveolata présents au sein de ce dernier groupe se divisent en 3 embranchements : les Dinoflagellata, les Ciliata et les Apicomplexa. Les Apicomplexa constituent un large phylum regroupant les Gregarinae, les Cryptosporidia, les Haematozoa et les Coccidia (figure 1). Plus de 6000 espèces d'Apicomplexes sont actuellement identifiées.

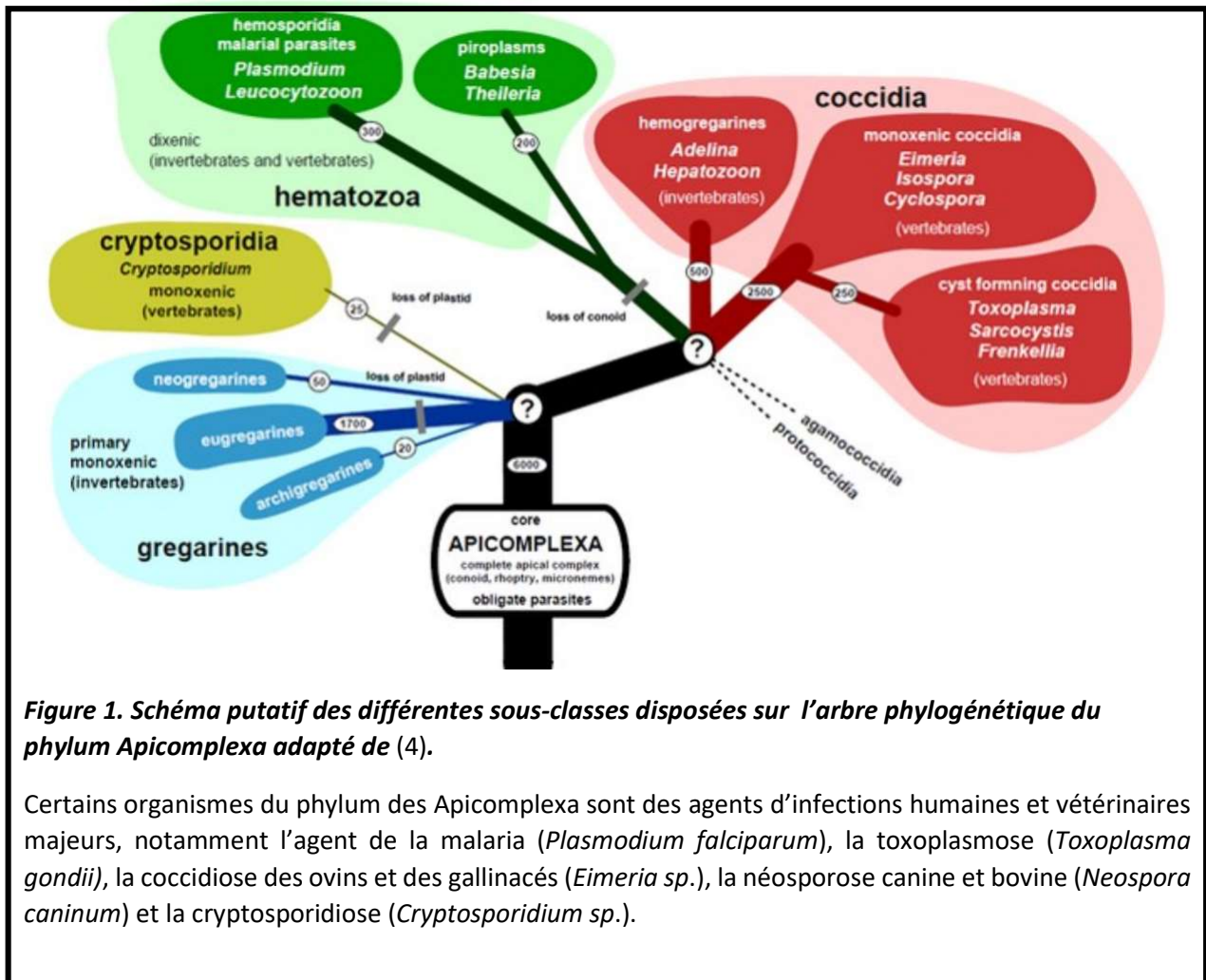


Figure 1. Schéma putatif des différentes sous-classes disposées sur l'arbre phylogénétique du phylum Apicomplexa adapté de (4).

Certains organismes du phylum des Apicomplexa sont des agents d'infections humaines et vétérinaires majeurs, notamment l'agent de la malaria (*Plasmodium falciparum*), la toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*), la coccidiose des ovins et des gallinacés (*Eimeria sp.*), la néosporose canine et bovine (*Neospora caninum*) et la cryptosporidiose (*Cryptosporidium sp.*).

Outre la toxoplasmose, les parasitoses Apicomplexes ont un lourd impact économique et en termes de santé humaine ou vétérinaire. Nous proposons ici un descriptif rapide de quelques parasitoses apicomplexes majeures autre que la toxoplasmose :

1.2.1 Le paludisme

Provoqué par *Plasmodium falciparum* (responsable de la majorité des morts), *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium vivax*, la malaria est la parasitose la plus importante par le nombre de morts qu'elle génère (627000 en 2020), principalement des enfants de

moins de 5 ans et des femmes enceintes. Le paludisme se transmet d'Homme à Homme par l'intermédiaire de la pique de moustique femelle : l'Anophèle. L'Homme est un hôte intermédiaire au sein duquel le parasite se reproduit de façon asexuée. La première phase de l'infection est asymptomatique et correspond à la phase « pré-érythrocytaire » durant laquelle le parasite transmis par la pique du moustique infecte les cellules hépatiques et se multiplie. Durant la deuxième phase de la maladie, la phase érythrocytaire, le parasite envahit les érythrocytes, s'y divise et lyse les hématies. Les symptômes apparaissent durant cette étape, entre 9 et 30 jours après l'infection et se présentent sous forme de fortes fièvres, des céphalées et des douleurs musculaires. Selon les estimations de l'OMS, en 2019, 229 millions de cas de paludisme ont été répertoriés dont 409000 décès. Le traitement contre la maladie est mis à mal par l'apparition de souches résistantes (5) et la découverte d'un vaccin constitue aujourd'hui un enjeu important.

1.2.2 La babesiose

Très proche du paludisme par ses aspects pathogéniques, la babesiose (ou piroplasmose) est transmise aux vertébrés par la pique du tique Ixodes. Caractérisée par deux phases infectieuses très similaires au paludisme, la babesiose constitue principalement un risque vétérinaire (*Babesia canis* chez le chien) et économique (*Babesia divergens* dans les élevages bovins). L'Homme n'est infecté que dans de rares cas.

1.2.3 La néosporose

La néosporose est une maladie qui a un lourd impact économique au niveau des élevages bovins. Avec un coût estimé à un milliard de dollars sur l'économie mondiale chaque année, il est considéré que 15 à 20% des avortements chez les bovins sont à lui imputer ainsi qu'un nombre important d'avortements chez les juments(6). Aucun traitement efficace, ni vaccination existe contre *Neospora caninum* et le seul moyen de lutte reste la sélection de parents sains afin d'empêcher une transmission verticale du parasite.

1.2.4 La cryptosporidiose

Zoonose diarrhéique causé par *Cryptosporidium*, la cryptosporidiose cause de lourdes pertes aux élevages bovins et ovins par l'infection de l'intestin et du tube digestif des mammifères entraînant une déshydratation, de la fièvre, une perte de poids et un affaiblissement. L'Homme se contamine par ingestion d'aliments ou d'eau contaminée par des excréments d'animaux infectés par *Cryptosporidium parvum* ou *Cryptosporidium hominis*.

1.2.5 Les coccidioses

Causées par des parasites du genre *Eimeria*, ces parasitoses représentent le premier fléau parasitaire dans les élevages avicoles. La multiplication massive de parasites dans les entérocytes cause des diarrhées hémorragiques, une perte de poids et une déshydratation pouvant conduire à la mort. Le coût de cette parasitose est estimé à plus de deux milliards de dollars chaque année dans le monde. La prophylaxie actuelle repose sur l'utilisation de drogues anticoccidiennes et de vaccins.

Compte tenu de la dangerosité de certains parasites apicomplexes et des coûts engendrés par leur impact sur le plan humain et vétérinaire, la recherche sur les apicomplexes apparaît comme une nécessité afin de réduire la mortalité, la morbidité et les coûts économiques liés à ces parasitoses.

1.3 Le toxoplasme : un cycle de vie complexe et une répartition globale

1.3.1 Trois types prédominants

Les souches de *T. gondii* sont classées dans trois types prédominants. Les 3 types diffèrent par leur vitesse de croissance, leur virulence dans un modèle murin, leur capacité à générer des kystes tissulaires et à traverser les couches épithéliales (la transmigraton) (7,8). Ces 3 types de parasites résultent d'un croisement génétique qui s'est opéré il y a 10000 ans (9).

Les souches de type I se caractérisent par une réplication rapide couplée à une virulence plus forte chez la souris. La souche la plus étudiée de type I est dénommée « RH » en référence aux initiales d'un enfant de 6 ans décédé d'encéphalite humaine aiguë due à *T. gondii* en 1938 dont la souche a été extraite (10). Celle-ci présente un taux de réplication élevé facilitant la manipulation génétique et le maintien en culture cellulaire (11). Cependant, le type I présente un désavantage majeur de par sa capacité réduite à générer des kystes matures *in vitro* comme *in vivo*. Il est toutefois possible d'exprimer un début de conversion bradyzoïte dans des conditions de stress aboutissant à l'expression de gènes et la production de protéines spécifiques aux bradyzoïtes telles que des composants de la paroi du kystique (12,13).

Les souches de type II sont les souches les plus communément rencontrées lors d'infections humaines en Europe et Amérique du Nord. En France, plus de 90% des souches isolées de patients sont des parasites de type II (14). Ces souches présentent un taux de réplication plus faible, se différencient facilement en bradyzoïtes et sont hypovirulentes chez la souris.

Les souches de type III sont caractérisées par leur avirulence chez la souris (15) et ont un taux de réplication faible. Elles ont la capacité de se différencier en bradyzoïtes.

Entre ces trois groupes, seuls 2% des nucléotides sont différents, montrant ainsi une faible diversité génétique (16). Cependant, il est à noter l'existence de souches atypiques essentiellement localisées en Asie, en Afrique et en Amérique du Sud. Ces souches exotiques présentent des polymorphismes uniques et une plus grande diversité allélique. Cette diversité génétique est maximale en Amérique du Sud notamment dans la zone amazonienne où les génotypes classiques sont remplacés par des lignées clonales communes de ces régions (16). En Amérique du Sud, au moins 150 génotypes regroupés en haplogroupes 4 à 15 (17,18) ont été isolés. Certaines de ces souches atypiques ont été associées à des épidémies de toxoplasmose humaine sévère (19) caractérisées par des atteintes pulmonaires graves (20).

L'existence de nombreux hôtes potentiels notamment parmi les modèles animaux régulièrement utilisés en laboratoire et la manipulation génétique aisée ont longtemps fait de *T. gondii* un modèle d'étude de la biologie des parasites Apicomplexes.

1.3.2 Un cycle de vie complexe

Toxoplasma gondii est un organisme hétéroxène. Différentes formes parasitaires sont observables à travers un cycle de vie complexe. Ce cycle de vie peut être divisé en deux parties, un cycle court (monoxène) sexué qui se passe chez l'hôte définitif (le félin) (figure 2, cycle rouge) et un cycle long (hétéroxène) (figure 2, cycle bleu) durant lequel le parasite peut infecter plusieurs hôtes homéothermes dit intermédiaires tout en gardant la capacité de retourner chez le félin pour y effectuer sa reproduction sexuée.

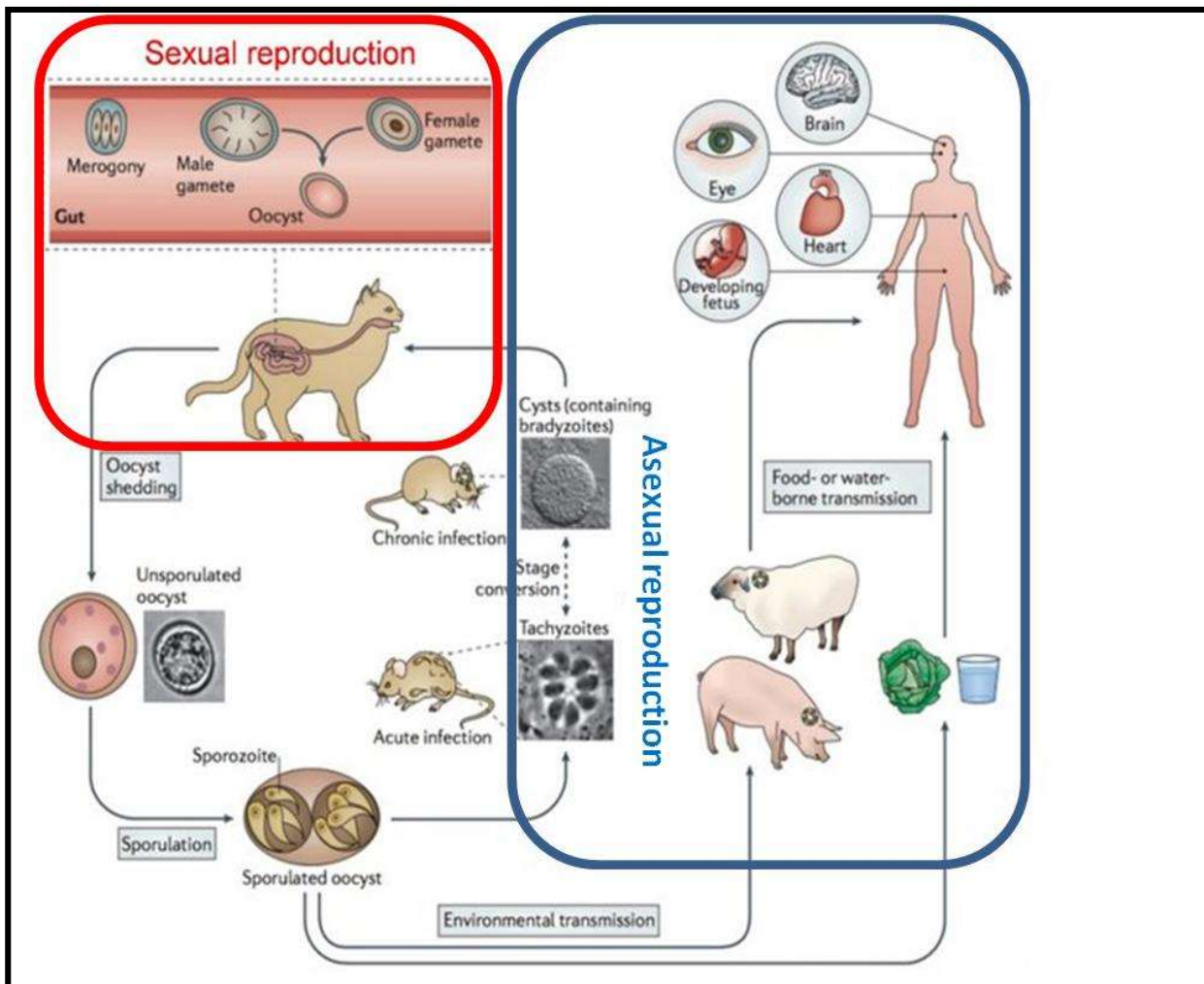


Figure 2. Le cycle de vie de *T. gondii* : Chez l'hôte intermédiaire, une réplication asexuée se produit. L'infection aiguë est causée par des tachyzoïtes à réplication rapide qui se disséminent dans tout l'organisme. La différenciation en bradyzoïtes à croissance lente dans les kystes tissulaires conduit à une infection chronique à long terme. Chez le chat ou les félinés, la réplication dans les entérocytes de l'intestin permet le passage vers un cycle sexué où les gamètes mâles et femelles se forment. Leur fusion conduit à la formation d'oocystes diploïdes qui sont excrétés dans les fèces du chat et subissent la méiose dans l'environnement pour produire huit descendants haploïdes. Les oocystes sont capables de survivre dans l'environnement pendant de longues périodes et peuvent contaminer les aliments et l'eau fournissant une voie d'infection pour les hôtes intermédiaires. L'ingestion de kystes tissulaires via une alimentation omnivore ou carnivore peut entraîner une transmission à d'autres hôtes intermédiaires ou aux chats (21).

Plusieurs formes parasitaires distinctes sont observables tout au long du cycle de vie : ces étapes prolifératives et de différenciation sont indispensables à la survie de *T. gondii*. Ce parasite présente une adaptation optimale à son environnement par sa capacité à infecter un grand nombre d'hôtes homéothermes différents et à échapper à la réponse immunitaire de l'hôte sur le long court.

1.3.3 La phase sexuée :

Le cycle sexué de *T. gondii* ne peut se faire que chez les félinés. Cette particularité serait due à l'absence d'une activité delta-6-saturase intestinale nécessaire au métabolisme de l'acide linoléique, entraînant un excès systémique d'acide linoléique qui serait nécessaire à l'initiation du cycle sexué (22). La contamination se fait par ingestion de kystes parasitaires ou par ingestion de sporozoïtes contaminant l'eau de boisson. Des enzymes protéolytiques tels que la pepsine vont dégrader la paroi des oocystes ou des kystes dans l'estomac et libérer respectivement les sporozoïtes et bradyzoïtes qui infecteront les entérocytes de l'hôte. Les parasites vont se différencier en mérontes et se diviser de façon asexuée (endopolygénie) pour donner des mérontes, et se différencier ensuite en gamètes (la gamogonie). La reproduction sexuée est alors possible par fusion des gamètes mâles et femelles qui formeront un oocyste. Celui-ci sera relargué dans le milieu extérieur dans les fèces 3 à 7 jours après infection du félin. Les oocystes vont sporuler et former 2 sporocystes qui donneront 4 sporozoïtes chacun par sporogonie (figure 3).

1.3.4 La phase asexuée :

Chez l'hôte intermédiaire, les voies de contamination sont similaires à l'hôte définitif. Chez l'Homme, deux phases sont caractérisées par des formes de développements parasitaires distinctes : la forme tachyzoïte est la forme de prolifération active, capable de parasiter tout type cellulaire nucléé et responsable de la phase aiguë de la maladie. Après infection des entérocytes du tube digestif, par les bradyzoïtes ou sporozoïtes, les parasites vont se différencier en tachyzoïtes. Ceux-ci peuvent alors infecter les cellules circulantes de l'immunité afin de se disséminer dans tout l'organisme. Certains parasites vont spontanément se différencier et s'enkyster dans certains types cellulaires tels que les neurones, les cellules de l'œil constituant la macula (cellules cônes qui sont des cellules photoréceptrices spécialisées dans la perception des détails et des couleurs et/ou des cellules neuronales responsables de la transmission de l'information optique, actuellement le type de cellules infectées au sein de l'œil n'a pas encore été précisément défini) et les cellules musculaires formant ainsi des kystes intracellulaires pouvant contenir jusqu'à plusieurs milliers de bradyzoïtes chacun. Ce stade est responsable de la phase chronique de la maladie. En effet, les bradyzoïtes contenus dans les kystes échappent au système immunitaire (figure 3).

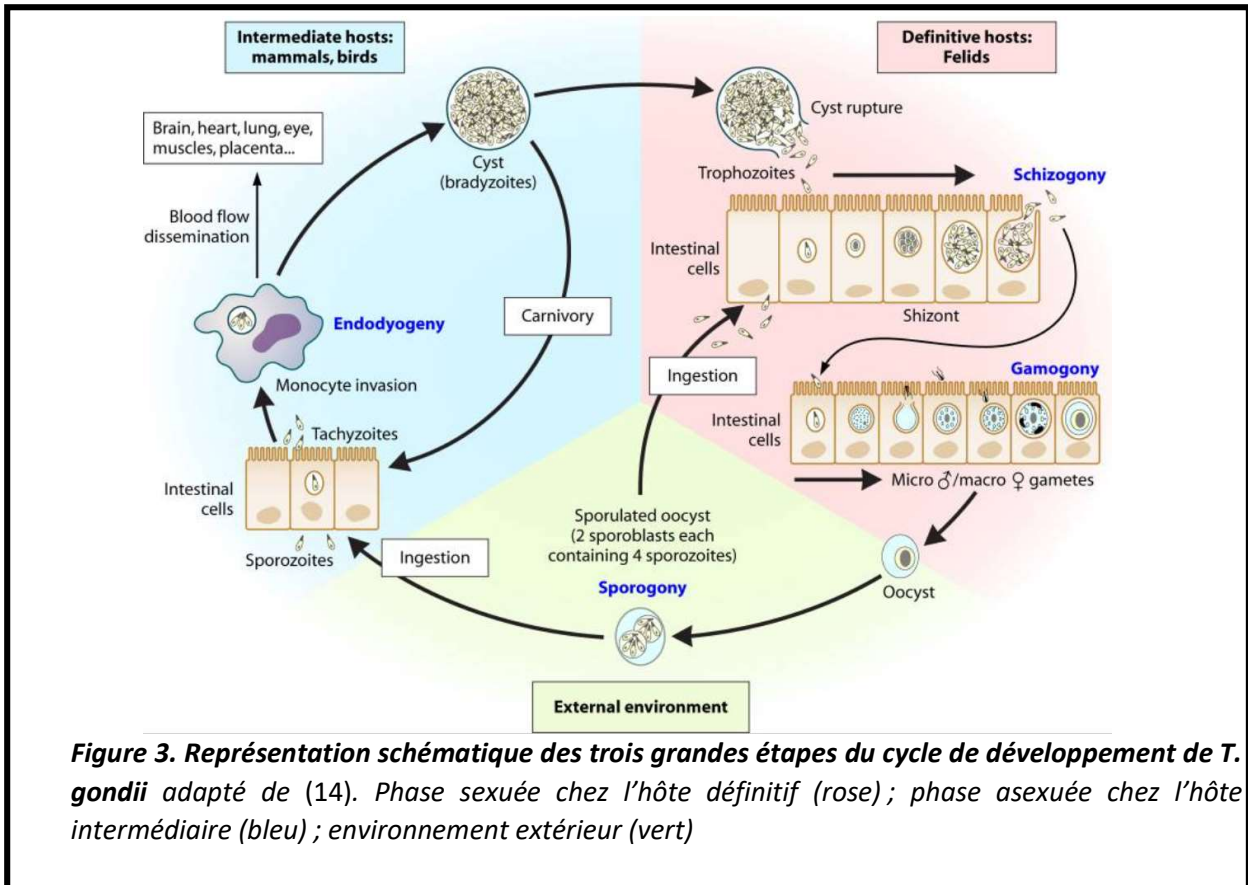


Figure 3. Représentation schématique des trois grandes étapes du cycle de développement de *T. gondii* adapté de (14). Phase sexuée chez l'hôte définitif (rose) ; phase asexuée chez l'hôte intermédiaire (bleu) ; environnement extérieur (vert)

2 *La toxoplasmose, prophylaxie et traitement*

2.1 *La toxoplasmose humaine*

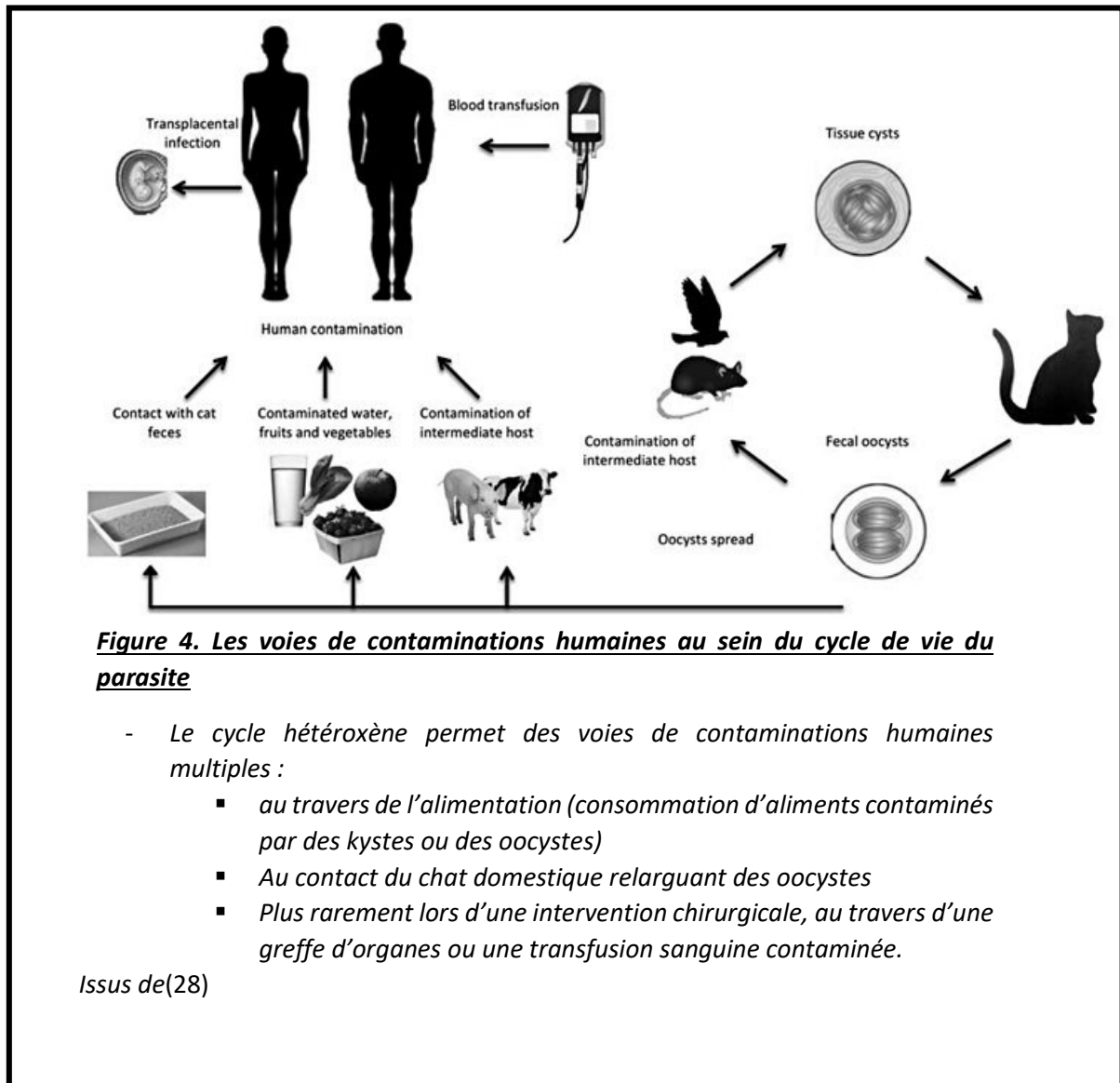
En France, environ 50% de la population était séropositive à la toxoplasmose jusque dans les années 90 (54% en 1995), mais ce chiffre tend à diminuer : 44% en 2003 et 37% en 2010 (Rapport de l'agence française de la sécurité sanitaire des aliments ; 2006 ; <https://www.vie-publique.fr/sites/default/files/rapport/pdf/064000311.pdf>). Ce pourcentage élevé par rapport à la séropositivité mondiale semble être admis comme dû à la consommation de viandes crues ou peu cuites issues des habitudes alimentaires sans que cet argument ne soit étayé par des données statistiques publiées.

Deux modes de contamination principaux sont identifiés chez l'Homme :

- La contamination horizontale se fait par ingestion de kystes (23,24) présents dans l'alimentation carnée ou d'oocytes sporulés (25). Une étude menée en France en 1999 a déterminé les facteurs de risque de transmission principaux et leur classement quant au risque de contamination qu'ils représentent. Elle utilise le calcul de l'odd-ratio (OR) qui permet d'exprimer le risque qu'un événement entraîne une contamination. Il est calculé après enquête sur les habitudes de vie entre un groupe de femmes enceintes contaminées et un groupe de femmes enceintes non contaminées. Plus un événement présente un OR supérieur à 1 et plus il apparait comme facteur à risque (26).

Les résultats de cette enquête démontrent que le risque accru de contamination est lié :

- Au manque d'hygiène des mains (avec un odd-ratio (OR), ou autrement dit un risque relatif, très important de 9,9)
 - A la consommation de viande de bœuf mal cuite (OR = 5,5)
 - A la présence d'un animal domestique (OR =4,5)
 - A la consommation fréquente de légumes crus ramassés en dehors de la maison (OR = 3,1)
 - A la consommation d'agneau mal cuit (OR = 3,1)
- La contamination verticale correspond à l'infection de la femme enceinte qui, lors d'une primo-infection, ne présente pas d'immunité contre cette parasitose (27). Le tachyzoïte peut alors traverser le placenta et infecter le fœtus (Figure 4).



Dans de très rare cas, l'infection intervient lors d'une transplantation de tissus contenant des kystes ou par transfusion sanguine contaminée par des parasites circulants (29).

2.1.1 Toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent

La phase aiguë de la maladie se traduit généralement par la manifestation de symptômes bénins (légère fièvre, courbatures), mais est dans la plupart des cas asymptomatiques (30,31). Très rarement, des atteintes viscérales sévères sont observées. En Amérique du Sud (plus précisément en Guyane française et au Suriname), des cas de toxoplasmose systémique sévère entraînant la mort de personnes immunocompétentes infectées par une souche atypique du parasite ont été signalés (19).

2.1.2 La toxoplasmose congénitale

Une primo-infection chez la femme enceinte peut aboutir à une toxoplasmose congénitale par passage du parasite circulant au fœtus au travers du placenta et est susceptible de provoquer de graves

malformations congénitales voire un avortement spontané. L'incidence de la transmission du parasite au fœtus est fonction de l'âge gestationnel. Le risque de transmission augmentant avec l'avancement de la grossesse. En effet, l'augmentation de la surface du placenta va favoriser un risque de passage du tachyzoïte au fœtus. En cas de dépistage positif, des antibiotiques (spiramycine et sulphonamide) peuvent être prescrits pour essayer de réduire le risque de transmission de la mère à l'enfant ainsi que la gravité de l'infection chez le bébé à naître.

Inversement, en cas d'infection du fœtus, la gravité diminue avec l'avancée de la grossesse, celle-ci étant directement liée à la maturité du système immunitaire de l'enfant (32). Une infection en début de grossesse présente donc un risque majeur de malformations neurologiques sévères voire d'avortement (33). Les enfants infectés *in utero* et ne présentant pas *a priori* de symptômes ont un risque de lésion oculaire à vie appelée chorioretinite pouvant mener à la cécité en cas d'atteinte bilatérale (34).

2.1.3 La toxoplasmose du sujet immunodéprimé

Une défaillance du système immunitaire et en particulier une déficience de la sécrétion de l'interféron gamma (INF- γ) représente le scénario favorable à l'apparition de formes graves de la toxoplasmose. Ces dernières peuvent être dues soit à une primo-infection, soit à une réactivation de kystes issus d'une infection passée. Une conversion bradyzoïte-tachyzoïte et une prolifération massive de parasites peut s'opérer suite à la disparition de la pression immunitaire.

Lors de certaines affections ou de greffe de moelle osseuse, la disparition des cellules circulantes de l'immunité par traitement chimique ou irradiation de la greffe va affaiblir drastiquement les défenses immunitaires du patient receveur qui peut alors présenter une défaillance multi-viscérale liée à une dissémination massive du parasite. Chez les patients bénéficiant de certaines greffes d'organes (notamment le cœur), l'apport de parasites par le greffon à un receveur séronégatif à la toxoplasmose présente une très grande probabilité de réactivations kystiques et de développement de complications graves sans traitement approprié. En service d'hématologie, 6 % des patients déclarent une toxoplasmose dans les trois mois qui suivent une greffe aboutissant au décès du patient dans 66% des cas (35,36).

Bien que les cas de toxoplasmose chez des individus ayant déclaré un SIDA soient en nette diminution depuis l'utilisation des antirétroviraux, 250 cas par an sont identifiés depuis la mise en place des protocoles de HAART (Highly active antiretroviral therapy) ou traitement antirétroviral hautement actif (37). Selon la même étude en 2006, une augmentation de parasitoses liées aux transplantations d'organes et transfusions sanguines était observée.

2.1.3.1 La toxoplasmose cérébrale

La manifestation clinique la plus répandue chez les immunodéprimés est la toxoplasmose cérébrale qui s'accompagne généralement de symptômes tels que la fièvre, des céphalées, des troubles moteurs, sensitifs ou psychiatriques (38).

Très fréquente dans le cas de patients atteints par le VIH, cette affection était une des principales causes de décès avant l'introduction de traitements antirétroviraux (39). Une diminution importante des lymphocytes T (<100/mm³) représente un facteur à risque élevé d'une réactivation de kystes (40). Chez ces patients, la toxoplasmose cérébrale est la deuxième infection opportuniste après la pneumocystose

pulmonaire. Elle se traduit par l'apparition de lésions cérébrales appelées « cocardes » observées à l'imagerie sous forme d'abcès souvent multiples faiblement denses au centre caractéristique d'une nécrose et une hyperdensité en périphérie résultant de l'inflammation (Figure 5). L'observation de ces aspects lors d'une infection au SIDA, couplée avec une sérologie positive en IgG anti-*Toxoplasma* est une indication pour la mise sous traitement contre la toxoplasmose du patient (Moulinier A and Moulonguet A. 2004. Manifestations neurologiques. In : VIH, 6ème édition Douin éditeurs, Rueil-Malmaison. 635 pp).

2.1.3.2 La toxoplasmose oculaire

Très répandue chez les personnes infectées *in utero*, la toxoplasmose oculaire est également susceptible de concerner 10 à 20% des patients infectés post-natal. Elle se traduit par des troubles visuels pouvant s'avérer irréversibles et l'apparition de corps flottants dus à la destruction de parties postérieures de l'œil (la rétine). Elle résulterait le plus souvent d'une réactivation kystique au niveau de la rétine (Figure 6).

La rétinochoroïdite est la manifestation oculaire de la toxoplasmose congénitale la plus fréquente. Une perte irréversible de la vision centrale peut apparaître en cas d'atteinte de la macula et/ou du nerf optique, ou de complications tel le décollement de rétine. Environ 25% des patients atteints de toxoplasmose oculaire présente une baisse mesurable de la vision. L'atteinte du champ visuel serait bien plus fréquente car présente dans environ 2/3 des cas (41).

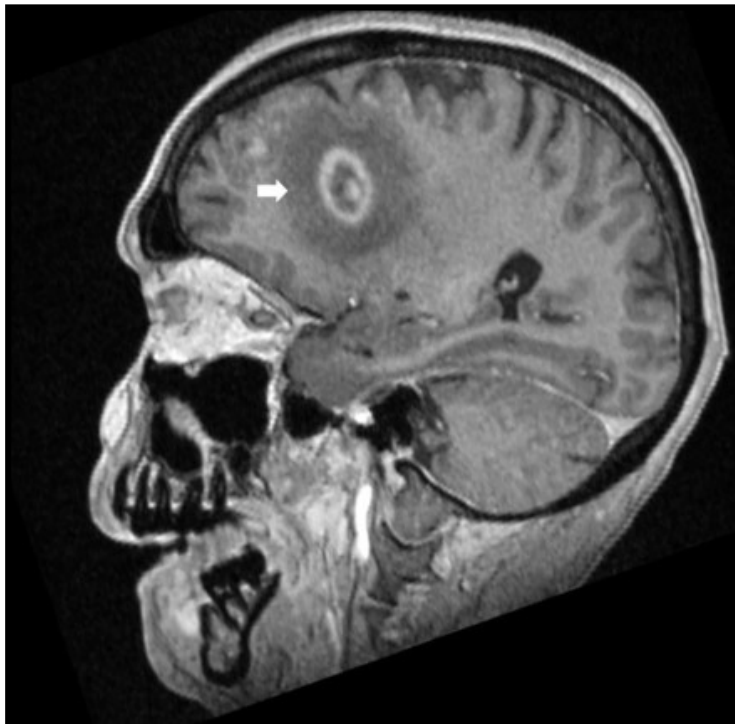


Figure 5. Imagerie cérébrale (IRM avec injection de marqueur de contraste). Une lésion de nécrose avec œdème vasogénique environnant (flèche) évocatrice de toxoplasmose cérébrale en prise de contraste périphérique. Abscès cérébral souvent associé à une fièvre (50% des cas) et des troubles épileptiques. Issu de (42).

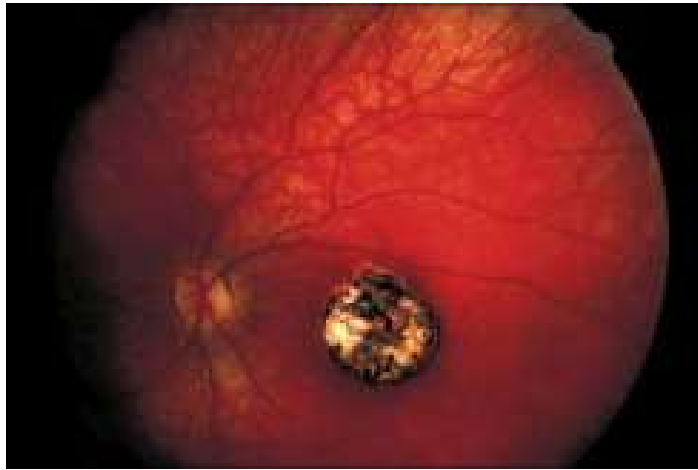


Figure 6. Fond d'œil : Chorioretinite consécutive à une toxoplasmose congénitale
(lésions cicatricielles pigmentées et une lésion active claire).
Issu de (43)

2.1.3.3 La toxoplasmose pulmonaire

En cas de profonde immunodépression, de graves atteintes pulmonaires potentiellement mortelles peuvent survenir dans de rares cas sous forme de pneumopathies (44). Avec le succès de la thérapie antivirale chez les patients atteints du VIH, la toxoplasmose pulmonaire est désormais plus fréquemment observée chez les patients présentant un autre déficit immunitaire que le SIDA (45), tels que les patients greffés (46,47), les personnes âgées présentant un système immunitaire affaibli et les nourrissons dont l'immunité est encore immature. Le développement de diagnostics précoces de ces infections constitue un enjeu majeur permettant de réduire les coûts médicaux, la morbidité et la mortalité qui sont malheureusement très élevés dans cette pathologie.

De nouveaux géotypes atypiques issus d'Amérique du sud (génotype ToxoDB # 13 des Caraïbes et ToxoDB # 6 du Brésil) sont caractérisés pour présenter une virulence accrue chez la souris et peuvent provoquer plus fréquemment des pneumopathies présentant des charges parasitaires significativement plus élevées dans les poumons et les yeux tant chez les immunodéficients que les immuno-compétents (20).

2.1.4 Données épidémiologiques

Avec une prévalence de 1/3 de la population mondiale, la séropositivité varie d'une région à une autre en fonction des habitudes alimentaires, des facteurs environnementaux (températures extérieures) et des groupes ethniques (48). Cette variabilité va de 7 à 80% en fonction des différentes zones géographiques du globe. Par exemple, elle est inférieure à 30% en Asie et en Amérique du Nord et supérieure à 60% en Afrique et Amérique du Sud. En France, d'après le Centre National de Référence (CNR) de la toxoplasmose, le nombre d'infections annuel est estimé entre 200000 et 300000, dont 10% d'infection symptomatiques. En 2007, le CNR a dénombré 272 cas de toxoplasmose congénitale sur 867 308 naissances en France et dans les DOM. Ce chiffre tend à diminuer avec 116 cas pour 701 819 naissances en 2021. Seule une primo-infection sur 4 de la femme enceinte aboutit à une toxoplasmose congénitale en France (33,49). En 2018, la toxoplasmose congénitale présentait une incidence de 2,9/10 000 naissances. En France, le dépistage et la surveillance de la toxoplasmose ont été rendus obligatoire

par les décrets du 17 mars 1978 et du 14 février 1992 chez les femmes enceintes avant la fin du premier trimestre de grossesse. Cependant, cette surveillance n'est pas harmonisée à l'échelle de la planète.

En Amérique du Sud, les formes graves de toxoplasmose sont plus répandues que dans d'autres parties du monde, sans doute causées par la plus grande diversité génétique de souches présentes sur ces territoires (50,51).

En termes de santé vétérinaire, *T. gondii* représente également un double problème à travers l'infection du bétail :

- Les kystes se développent chez les animaux infectés et sont susceptibles de contaminer l'Homme par consommation de la viande. En raison de la forte incidence de la toxoplasmose chez les animaux utilisés pour la consommation humaine (52,53), *T. gondii* est classé parmi les agents pathogènes d'origine alimentaire sous surveillance. Les « Centers for Disease Control » (États-Unis) classent *T. gondii* parmi les trois agents pathogènes, ainsi que *Listeria* et *Salmonella*, responsables de 70 % des décès d'origine alimentaire aux États-Unis (54).
- La toxoplasmose est responsable d'avortements chez les ovins en cas de primo-infection entraînant des pertes économiques conséquentes pour la filière. Un vaccin a été développé dans le but de limiter ces pertes et reposant sur une souche parasitaire (S48) incapable de s'enkyster. Son administration à la brebis avant la gestation a pour but d'immuniser l'animal et d'empêcher le développement de parasites et de kystes chez le fœtus lors d'une primo-infection (55).

2.1.5 Le diagnostic

Un diagnostic précis et précoce de la toxoplasmose est essentiel pour une thérapie appropriée. Aujourd'hui, le diagnostic moléculaire et le sérotypage sont largement utilisés pour le diagnostic de la toxoplasmose dans de nombreux pays. Pour déterminer si un individu a été infecté dans un passé lointain ou a été infecté récemment, une combinaison de tests sérologiques est généralement nécessaire.

Il existe plusieurs méthodes de détection du parasite chez l'homme et l'animal. La majorité sont des tests ELISA de dosage des antigènes recombinants ou d'anticorps circulants et des tests par détection peptidiques (56). Des techniques de type « western blot » sont utilisées pour faire la distinction entre les anticorps spécifiques à la mère et ceux générés par le nouveau-né au cours des six premiers mois de sa vie, en plus des techniques de laboratoire classiques (57,58). Enfin, la réaction de polymérisation en chaîne en temps réel après transcription reverse (RT-PCR) est une méthode très sensible capable de donner un résultat quantitatif en terme de parasitémie (59–61). Cette dernière est indiquée au diagnostic de la toxoplasmose chez les patients immunodéprimés, chez les greffés ou en cas d'atteinte fœtale, car elle permet une détection sensible, rapide et spécifique du parasite.

Certains diagnostics ont été développés pour éviter la nécessité de techniques plus intrusives sur le fœtus et permettre un dépistage sur des prélèvements rapides à effectuer dont la mise en œuvre présente un minimum de risques possibles pour le sujet testé. La PCR conventionnelle et la RT-PCR sont bien adaptées à l'utilisation d'une large variété d'échantillons cliniques et sont donc utilisées afin de détecter la maladie et le génotype de la souche infectante dans divers prélèvements, tel que le sang, le liquide céphalo-rachidien ou le liquide amniotique (62).

La PCR conventionnelle et la RT-PCR ont également permis le développement de techniques de détections précoces par prélèvement intra-utérin (63).

2.2 Prophylaxies, traitements et nouvelles voix thérapeutiques

2.2.1 *Thérapeutiques conventionnelles*

Actuellement, les traitements permettant de lutter contre la toxoplasmose sont dirigés contre 3 voies métaboliques : la voie de synthèse des folates, les voies de synthèse métaboliques de l'apicoplaste et celle du transport d'électrons dans la membrane mitochondriale. Ces médicaments utilisés pour traiter la toxoplasmose ont généralement des effets secondaires importants (64–66) et nécessitent des traitements prolongés allant de quelques semaines à plus d'un an. La nécessité de longues durées de traitement et le risque de récurrence de la maladie sont en partie dues au manque d'efficacité contre les kystes tissulaires quiescents.

2.2.1.1 *La voie de synthèse des folates :*

Les folates entrent dans la voie de synthèse des nucléotides et sont essentiels à la division du parasite et donc à sa survie. Deux enzymes sont impliquées dans la synthèse des folates : la dihydroptéroate synthétase (DHPS) qui est absente chez les mammifères et la dihydrofolate réductase (DHFR). La DHFR est présente chez l'Homme et l'utilisation de composés inhibant cette voie induit une carence en folates chez l'hôte responsable d'effets tératogènes et hématopoïétiques. Ces traitements sont donc accompagnés d'un apport en folates. La pyriméthamine est l'inhibiteur de la DHFR le plus utilisé car très efficace contre *T. gondii*.

Les sulfones et sulfonamides (principalement sulfadiazine) sont des inhibiteurs du DHPS, présentent une faible efficacité et occasionnent des effets secondaires bénins. Cependant, la synergie entre inhibiteur de DHPS et DHFR potentialise les effets et justifie depuis les années 50 (67) l'administration en duo de la pyriméthamine-sulfadiazine comme schéma thérapeutique classique.

A la différence de *Plasmodium falciparum*, le risque d'apparition de foyers de résistance à ce traitement est faible chez *T. gondii* pour 2 raisons principales : l'absence de traitement de masse de la population et de passage du parasite d'homme à homme. En effet, les patients sont traités individuellement sans risque de contaminer leurs proches, une mutation ou plusieurs mutations sont donc susceptibles d'apparaître (68) chez un patient traité au long court, mais sans risque de dissémination de cette résistance. Les problèmes rencontrés avec ce traitement sont donc axés sur des intolérances très fréquentes auxquelles s'ajoute la pénurie de traitement alternatif.

Bien qu'utilisé en première intention, la pyriméthamine couplée à la sulfadiazine présente de nombreux effets secondaires pouvant s'avérer très délétères pour le patient. Leur substitution par d'autres composés est alors indispensable en cas d'intolérance, toxicité ou inefficacité du traitement. Lors d'une toxoplasmose encéphalite, le manque d'efficacité conduit à la substitution de ce traitement chez un tiers des patients (69). Si la pyriméthamine n'est pas tolérée, le couple triméthoprime-sulfaméthoxazole est aussi efficace que la pyriméthamine-sulfadiazine et peut également être utilisé comme alternative.

2.2.1.2 *La voie de synthèse de l'apicoplaste*

L'apicoplaste est un organite possédant son propre ADN circulaire de 35kb, résultant de l'internalisation par endosymbiose d'une algue verte au cours de l'évolution des Apicomplexes (70). Celui-ci est essentiel à la survie du parasite et sa disparition conduit à la mort du parasite. Les macrolides (spiramycine, roxithromycine, clarithromycine, clindamycine, azithromycine, et kétolides) sont connus pour inhiber la

réplication de l'apicoplaste et présentent donc un intérêt thérapeutique contre le parasite, notamment la clindamycine et l'azithromycine (37). Lors d'intolérance au traitement classique, la sulfadiazine peut être substituée par la clindamycine en synergie avec la pyriméthamine afin de limiter le risque d'intolérance cutanée (71). Cependant, pour une toxicité similaire, la clindamycine est moins efficace pour prévenir les rechutes (72).

En cas de primo-infection en cours de grossesse, la spiramycine est le seul macrolide à être administré en monothérapie afin de diminuer le risque de transmission transplacentaire.

2.2.1.3 La voie de l'ubiquinone dans la mitochondrie

Certains composés vont cibler la mitochondrie : Les hydroxy-1,4-naphthoquinones (73). Parmi ces composés, l'atovaquone entre en compétition avec l'ubiquinone et perturbe le transport d'électrons dans la membrane mitochondriale et indirectement, la voie de synthèse de l'ADN. En effet, plusieurs enzymes parasitaires liées au système de transport d'électrons mitochondrial sont inhibées par ces composés. Parmi ces enzymes figure la dihydrofolate déshydrogénase (DHOD), qui est nécessaire à la biosynthèse des pyrimidines. Étant donné que les parasites apicomplexes sont incapables de récupérer de l'hôte les pyrimidines ou de le synthétiser *de novo*, l'inhibition de la DHOD entraîne la mort du parasite. L'atovaquone est utilisé dans le traitement du paludisme et de la toxoplasmose. Chez *T. gondii*, elle représente une des rares molécules actives contre les formes enkystées du parasite.

L'atovaquone ou l'azithromycine peuvent être utilisées en association avec la pyriméthamine ou la sulfadiazine pour le traitement et la prophylaxie de la toxoplasmose lorsque le traitement de première intention est contre-indiqué. Cependant, ces thérapies ont des niveaux d'intolérance similaire au traitement de première intention (74).

Actuellement, le traitement le plus efficace contre la toxoplasmose reste donc l'association pyriméthamine-sulfadiazine (Tableau 2).

Les durées de traitement varient en fonction des manifestations cliniques :

- Pour une encéphalite à *Toxoplasma*, le traitement est d'au moins 6 semaines
- Concernant une infection congénitale, la durée de traitement est d'au moins 1 an
- Une infection oculaire est traitée de 4 à 6 semaines avec la considération d'une suppression continue pour prévenir les rechutes.

La prolongation de ces traitements est imposée par une efficacité limitée de ces médicaments sur le stade kystique du parasite (75,76).

Forme clinique	Traitement
Infection asymptomatique	NON
Infection symptomatique (fièvre modérée, ganglions)	NON/SPR
Primo-infection compliquée de l'immunocompétent	PYR/SULFA
Séroconversion grossesse	SPR
Toxoplasmose congénitale	PYR/SULFA
Toxoplasmose oculaire	PYR/SULFA
Infection de l'immunodéprimé	
- SIDA	PYR/SULFA
- Transplantés	PYR/SULFA
- Autre	PYR/SULFA

Tableau 2. Stratégies thérapeutiques et prophylactiques appliquées en fonction de la forme clinique de la toxoplasmose. Adapté de (77)

PYR : pyriméthamine; SULFA : sulphonamides ; SPR : spiramycine

Bien que des mesures préventives axées sur l'hygiène et la production de viande aient réduit la prévalence de l'infection humaine à *T. gondii*, ces mesures ne réduiront pas suffisamment le fardeau global de l'infection humaine à la toxoplasmose. De nouveaux composés thérapeutiques devront être découverts et leur développement devra répondre à quelques impératifs :

- un traitement plus efficace contre la toxoplasmose avec une diminution de la toxicité
- l'obtention de concentrations thérapeutiques dans le cerveau, les muscles et les yeux où le parasite s'enkyste
- un traitement qui serait actif à la fois contre les stades réplicatifs et latents
- la réduction de la durée de traitement
- la sécurité pendant la grossesse (absence d'effets tératogène)
- la création d'une formulation peu coûteuse et pratique.

Concernant ce dernier point, il apparaît que la distribution mondiale de la toxoplasmose dans des populations présentant des ressources médicales limitées indique qu'un nouveau médicament anti-*T. gondii* se doit d'être biodisponible par voie orale, avoir une formulation chimiquement stable et être peu coûteux à produire (ce qui est déjà le cas pour la pyriméthamine).

2.2.2 Nouvelles cibles thérapeutiques et perspectives

Nous avons explicité plus haut les limites des traitements actuels contre la toxoplasmose. De nouvelles stratégies et cibles thérapeutiques sont actuellement en cours d'exploration selon deux approches expérimentales : la découverte *de novo* de molécules actives contre une voie métabolique essentielle à la survie du parasite et la réorientation de composés pharmaceutiques déjà connus pour d'autres domaines thérapeutiques.

2.2.2.1 Détournement de molécules pharmaceutiques

Les techniques de criblage haut débit permettent de tester de grandes banques de composés déjà connus pour leur action thérapeutique dans d'autres maladies ou contre d'autres apicomplexes. Ces composés ont l'avantage d'être connus et parfois déjà utilisés pour leur faible toxicité chez l'Homme. Ainsi, de nombreux composés actifs contre le paludisme ou dirigés contre d'autres agents pathogènes apicomplexes ont démontré une grande efficacité contre *T. gondii* (78–80).

L'artémisinine, un antipaludique très efficace, ainsi que ses nombreux dérivés produits au fil des années, ont montré un potentiel dans le traitement de la toxoplasmose murine (81). L'artémisone et l'artémiside sont particulièrement intéressants et leurs efficacités ont été démontrées concernant la prolongation de la survie et la réduction de la charge de kystes cérébraux chez les souris infectées par les tachyzoïtes d'une souche de type II. L'artémisone et l'artémisine ont respectivement présenté des IC₅₀ *in vitro* de 0,120 et 0,108 µM contre *T. gondii*.

2.2.2.2 Principales cibles thérapeutiques potentielles

Les cibles thérapeutiques attractives sont les voies métaboliques chargées de la synthèse de composants non fournis par la cellule hôte (acides gras, stéroïdes et polyisoprénoïdes...). Idéalement, ces voies doivent être absentes ou différentes des voies correspondantes chez les mammifères. En particulier, les médicaments ciblant l'invasion et la sortie des cellules hôtes, ou qui interfèrent avec le processus de différenciation du parasite apparaissent comme prometteurs (81).

2.2.2.2.1 La voie de synthèse des folates et inhibiteurs de la chaîne de transport d'électrons

Les voies affectées par les médicaments actuellement utilisés (voie des folates et voie de transport des électrons) sont toujours considérées comme des cibles d'intérêt afin de trouver des médicaments plus efficaces et plus sûrs. Des analogues de pyriméthamine qui cibleraient spécifiquement le gène DHFR du parasite éviteraient les effets indésirables sur la voie de synthèse des folates de l'hôte. La dihydrotriazine JPC-2067-B est un composé antipaludéen testé sur *T. gondii*, efficace *in vitro* (EC₅₀ = 20 nM) bien que peu sélective et présentée comme efficace contre *T. gondii* *in vivo* (82). Le composé a également démontré une grande efficacité contre diverses souches atypiques virulentes *in vitro*.

Le complexe cytochrome *bc* 1 est également une cible médicamenteuse étudiée contre les parasites Apicomplexes, et notamment *T. gondii* (81). Les inhibiteurs du complexe cytochrome *bc*1 perturbent la respiration cellulaire en agissant sur la voie de transport des électrons par liaison au site Q_o ou Q_i du complexe. Le seul inhibiteur du cytochrome *bc* 1 utilisé en clinique est l'atovaquone, qui, comme les autres naphthoquinones, se lie au site Q_o. Son activité sur la charge tissulaire des kystes a été démontrée à la fois lorsqu'elle est utilisée seule (83) ou associée à la clindamycine (84). Les investigations plus poussées (85–87) ont démontrées une efficacité de nouveaux composés naphthoquinones contre le parasite. Ces composés présentent des IC₅₀ *in vitro* très faibles, de l'ordre du nanomolaire ou inférieur. Cependant, des mutations du site de liaison de ce composé sur le cytochrome *bc*1 peuvent apparaître, conduire au développement d'une résistance et limiter son utilisation (88). Une autre classe de composés est un groupe de dérivés 4-(1H)-quinolones avec des quinolones de type endochine (ELQ) qui est supposée se lier à l'autre site du cytochrome *bc*1, le site Q_i. Étant donné que l'atovaquone et les ELQ agissent sur des sites différents (Q_o et Q_i) d'un même complexe, il a été suggéré une combinaison de ces deux composés afin de créer une action synergique sur le complexe *bc*1 du parasite et de limiter le développement de résistances (89,90). Une série de 4-(1H)-quinolones contre des souches de type sauvage et résistantes à l'atovaquone a été testée dans un modèle murin. Ces expériences ont identifié

des composés très puissants qui inhibent la prolifération de *T. gondii* à des concentrations picomolaires *in vitro*. *In vivo*, dans un modèle murin, ces composés ont démontré des efficacités différentes entre eux : ELQ-316 est efficace contre la forme proliférative du parasite, mais n'a pas pu empêcher l'apparition de l'infection cérébrale et la mort des souris. A l'inverse d'un autre composé, ELQ-400, ayant permis la disparition de tout symptôme et de toute trace du parasite (91).

2.2.2.2.2 La perturbation de l'apicoplaste

L'apicoplaste est le siège de voies métaboliques essentielles à la survie du parasite et constitue donc une cible potentielle de médicament (92). Malgré la capacité de *T. gondii* à détourner certains acides gras de la cellule hôte à son profit, ceux produits dans l'apicoplaste sont nécessaires à la biogenèse des organites (93). La protéine réductase énoyl-acétyl (ENR) est impliquée dans la voie de synthèse des acides gras de type II (FAS II) (94). Le triclosan (5-chloro-2-[2,4-dichlorophénoxy] phénol) est un médicament antibactérien qui inhibe l'ENR et a été étudié dans des modèles murins de toxoplasmose aiguë et chronique (95,96). Son action a montré une réduction de la charge et de la viabilité des tachyzoïtes et des kystes *in vivo* chez la souris.

La voie des isoprénoïdes dans l'apicoplaste est également importante pour la survie du parasite, l'enzyme farnésyl-diphosphate/géranylgéranyl-diphosphate synthase étant essentielle pour la synthèse des stérols et des composés poly-isoprénoïdes. Une série de bisphosphonates nouvellement synthétisés, qui interfèrent avec la voie des isoprénoïdes par inhibition de cette enzyme, a montré une faible toxicité et une excellente activité contre *T. gondii in vitro* (IC₅₀ de 0,49 µM contre *T. gondii* pour un des composé testé) et *in vivo* (97).

2.2.2.2.3 Perturbation de la motilité du parasite

La voie dépendante du calcium, régulée par la protéine kinase 1 dépendante du calcium (TgCDPK1) contrôle les processus essentiels à la motilité de *T. gondii*, à l'invasion et à la sortie de la cellule hôte et diffère des kinases humaines (98). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de TgCDPK1 ont permis de réduire la charge parasitaire dans un modèle murin de *T. gondii* lors de l'infection aiguë mais a également considérablement réduit la charge de kystes cérébraux (de 88,7 %) lorsqu'ils étaient administrés cinq semaines après l'infection (99).

2.2.2.2.4 Perturbation de l'interconversion tachyzoïte-bradyzoïte

Les mécanismes régulant les différenciations tachyzoïte-bradyzoïte-tachyzoïte sont essentiels dans la pathogénèse du parasite et sa survie. Le blocage de la conversion vers une forme enkystée représente la possibilité de traiter la forme aiguë de la maladie sans développer de forme chronique, alors que le blocage de la conversion bradyzoïte vers tachyzoïte serait d'une grande importance pour les patients immunodéprimés chroniquement infectés, qui sont à risque de réactivation. Dans cette stratégie, plusieurs voies de recherche sont explorées :

Les nucléotides phosphodiesterases cycliques (PDE) sont des modulateurs critiques des niveaux cellulaires d'AMPc catalysant l'hydrolyse des nucléotides cycliques (100). Les agents provoquant des niveaux élevés d'AMPc inhibent la conversion de *Toxoplasma* au stade bradyzoïte (101). Les inhibiteurs de la phosphodiesterase-4 (PDE4) interfèrent avec l'interconversion tachyzoïte en bradyzoïte en

affectant les voies de signalisation de l'AMPC. Un inhibiteur de PDE4, le rolipram, permet une réduction de 74 % de la charge de kystes cérébraux chez les souris infectées de façon chronique (102).

Le contrôle de la traduction via la phosphorylation du facteur d'initiation eucaryote 2 de *T. gondii* (TgeIF2) est un interrupteur clé associé à la conversion de stade. Le guanabenz, un médicament antihypertenseur approuvé par la FDA, interfère avec le contrôle de la traduction en inhibant la déphosphorylation de la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction du facteur d'initiation eucaryote 2 chez *Toxoplasma* (103), sans impliquer l'eIF2 de l'hôte (104). Le Guanabenz a montré une activité sur les deux stades du parasite, c'est-à-dire qu'il était capable de protéger les souris contre la toxoplasmose aiguë, mais aussi de traverser la barrière hémato-encéphalique et de réduire le nombre de kystes cérébraux (jusqu'à 69 %) chez les souris chroniquement infectées (105). La concentration efficace à 50 % (CE 50) a été établie à 6 μ M pour le guanabenz. Le guanabenz permet également de réduire le niveau de neuro-inflammation au sein du cerveau de souris infectées, permettant ainsi une atténuation du comportement provoqué par la présence des kystes cérébraux notamment une réduction de l'hyperactivité (106).

Le guanabenz est métabolisé par le foie et doit être utilisé avec prudence chez les patients présentant une insuffisance hépatique. De plus, la sécurité n'a pas été établie chez les patients de moins de 18 ans. Un nouveau dérivé du guanabenz, la sephine 1, a été décrite comme étant un puissant inhibiteur de la déphosphorylation de eIF2 α (107). La sephin 1 manquait d'activité agoniste α 2-adrénergique mesurable dans un test cellulaire, ce qui peut s'avérer avantageux lors d'un traitement prolongé d'une infection parasitaire. Cependant, des limites à l'efficacité de ce médicament ont été démontrées. Actuellement les inhibiteurs de la déphosphorylation de Tg-eIF2 ne permettent pas d'éliminer la totalité des kystes cérébraux et les résultats sont très variables entre les différentes espèces de souris testées (108). De plus, l'efficacité du guanabenz a été étudiée en bithérapie avec la pyriméthamine. L'action du guanabenz favorisant le passage vers la forme proliférative des bradyzoïtes, la pyriméthamine qui est efficace contre le tachyzoïte est utilisée ici pour éliminer les parasites devenus prolifératifs. Cependant, après un traitement allant de 1 à 3 semaines, l'arrêt du guanabenz aboutit au retour du nombre de kystes à son niveau initial (109).

2.2.2.2.5 La perturbation de l'acétylation d'histones

Le niveau d'acétylation des histones constitue par son action de compaction/décompaction de la chromatine un mécanisme de régulation épigénétique majeur de la différenciation du parasite (110). Les histones acétyltransférases (HAT) responsables de l'acétylation des histones et les histones déacétylases (HDAC) qui inversement suppriment cette modification sont considérées comme des cibles thérapeutiques. En effet, l'acétylation des histones est fortement impliquée dans la régulation de l'interconversion entre forme proliférative et forme quiescente du parasite. Les HDAC ont été étudiées comme cibles pour le traitement de plusieurs maladies telles que le cancer et les maladies dégénératives (maladie d'Alzheimer). De nombreux inhibiteurs d'HDAC ont été approuvés par la Food and Drug Administration des États-Unis (111) contre certains cancers, en traitement des troubles cardiaques, des troubles neuro-dégénératifs, de l'inflammation et des troubles immunitaires, et de syndromes métaboliques.

Le passage dynamique entre diverses formes parasitaires étant essentiel à la pathogénicité, les enzymes responsables du niveau d'acétylation des histones apparaissent comme des cibles thérapeutiques de

choix (112). Divers composés ont été identifiés comme impliqués dans ces changements du niveau d'acétylation et présentent une efficacité contre *T. gondii* (Tableau 3).

2.2.2.2.5.1 Les inhibiteurs d'histones désacétylases (iHDAC) :

Les inhibiteurs d'histones désacétylases sont une nouvelle classe prometteuse d'agents antiparasitaires potentiels, plusieurs d'entre eux présentant une activité significative *in vitro*, *ex vivo* et, dans quelques cas, *in vivo* contre le parasite (Tableau 3). Malgré l'intérêt croissant pour leurs effets antiparasitaires, de nombreux points critiques doivent encore être abordés avant de faire évoluer les iHDAC vers des essais cliniques en tant que composés antiparasitaires. Les caractéristiques principalement recherchées dans l'élaboration d'inhibiteurs d'HDAC sont une forte efficacité d'inhibition et une sélectivité élevée *in vivo* pour le parasite par rapport aux cellules hôtes. Les résidus liés au zinc dans les HDAC et la cavité tubulaire entre le zinc et la surface des enzymes HDAC sont relativement bien conservés entre les enzymes humaines et parasitaires (113,114). La conservation des HDAC entre l'homme et le parasite pose ainsi des problèmes de sélectivité accrus.

En utilisant une stratégie de « réorientation des médicaments », les inhibiteurs d'histones désacétylases (iHDAC), qui sont actuellement cliniquement approuvés pour une utilisation contre le cancer, pourraient être utilisés pour le traitement de diverses infections parasitaires.

L'utilité des iHDAC en tant qu'agents antiparasitaires a été signalée pour la première fois il y a deux décennies, en 1996, Darkin-Ratray *et al.* ont révélé que le tétrapeptide cyclique naturel apicidine est doté d'une activité *in vitro* contre *P. falciparum* ($IC_{50} = 200$ nM) et un panel de parasites apicomplexes (*Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Neospora caninum*, *Besnoitia jellisoni*, *Eimeria tenella*, etc.) (115). Depuis lors, un nombre croissant de iHDAC appartenant à diverses classes structurales ont été étudiés et leur activité contre *T. gondii* est présentée dans le Tableau 3.

Inhibiteurs d'HDAC tétrapeptidiques cycliques :

Plusieurs iHDAC de type tétrapeptide cyclique ont montré la capacité d'inhiber la croissance de *Toxoplasma gondii*. Ils s'avèrent être les plus actifs *in vitro* à ce jour mais non sélectifs sur les cellules de mammifères (115). En plus de l'apicidine ($IC_{50} = 13-15$ nM), le tétrapeptide cyclique FR235222, isolé du bouillon de fermentation de l'espèce *Acremonium*, est doté d'une puissante activité contre les tachyzoïtes de *T. gondii* ($IC_{50} ; 10$ nM) et d'un index de sélectivité de 13 fois par rapport aux fibroblastes humains (HFF) (116). FR235222 est un inhibiteur spécifique de TgHDAC3. Les parasites traités par ce composé présentent une hyper-acétylation de l'histone H4 inhibant la croissance parasitaire avec une CE_{50} de 7,6 nM. Ce traitement a démontré un impact important dans la conversion de stade tachyzoïte-bradyzoïte avec une expression induite de protéines spécifiques de la forme bradyzoïtes, une morphologie altérée de ces pseudo-bradyzoïtes et des noyaux multiples. Des lignées parasitaires présentant une sensibilité diminuée à l'apicidine et au FR235222 et présentant des mutations ponctuelles au sein de TgHDAC3 (T99A et T99I) ont été isolées, apportant ainsi la preuve génétique que TgHDAC3 est la cible de ces composés. Fait intéressant, l'activité inhibitrice de FR235222 semble dépendre d'une insertion à deux résidus (T99 et A98) dans le site catalytique de TgHDAC3, exclusivement conservée dans la famille Apicomplexa et absente de toutes les autres HDAC eucaryotes caractérisées à ce jour (116). FR235222 est capable d'affecter également les kystes et les bradyzoïtes convertis *in vitro* et est actif sur les kystes *ex vivo*. En particulier, le traitement par FR235222 altère la capacité des bradyzoïtes à se convertir en tachyzoïtes sans endommager la paroi du kyste, de sorte que les

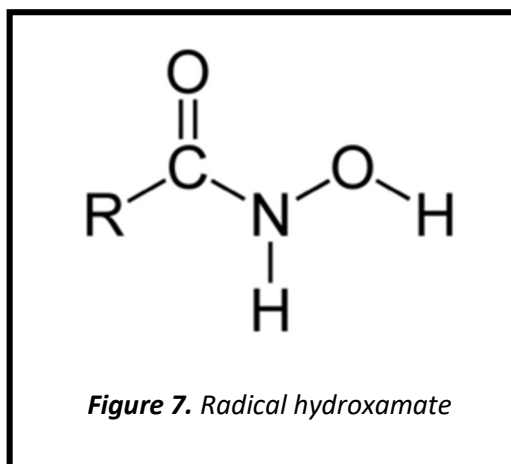
bradyzoïtes libres isolés après la lyse de la paroi cellulaire n'ont pas pu proliférer *in vitro*. Enfin, l'inoculation *in vivo* de kystes préalablement traités avec FR235222 n'a pas conduit à l'infection des souris gavées avec ceux-ci. Dans la même étude ont été rapportés deux analogues (W363 et W399) de FR235222 qui se sont avérés très actifs contre les tachyzoïtes et dotés d'une meilleure sélectivité (SI = 48–62) par rapport aux cellules HFF et pour cette raison plus adaptés aux futures études *in vivo* qui manquent encore pour le moment (117).

Inhibiteurs d'HDAC de type acide gras à chaîne courte :

Les iHDAC de type acide gras à chaîne courte, tels que l'acide valproïc (tableau 3), le butyrate de sodium, le 4-phénylbutyrate et les dérivés apparentés, sont des inhibiteurs d'HDAC de mammifères et présentent une faible toxicité. L'acide valproïc est déjà approuvé pour certaines indications thérapeutiques (épilepsie et troubles de l'humeur), et pourrait être intéressant pour une réutilisation dans les maladies parasitaires (118). Ces composés sont actifs *in vitro* dans la gamme micromolaire contre *T. gondii* mais souffrent d'une faible sélectivité par rapport aux cellules de mammifère (119,120).

Inhibiteurs d'HDAC de type hydroxamate :

Comme dans d'autres maladies humaines telles que le cancer, les iHDAC portant un radical hydroxamate (Figure 7) en tant que groupe de liaison au zinc (ZBG) représentent les iHDAC antiparasitaires les mieux étudiés (120,121). Ils ont montré des profils d'activité *in vitro* prometteurs contre les apicomplexes (120). De nombreux inhibiteurs des HDAC de classe I/II naturels ou synthétiques tels que la trichostatine A (120), l'acide subérylanilidehydroxamique ou SAHA (121), ou le SBHA (120) ont montré une activité contre les tachyzoïtes *in vitro* avec des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire. Plus récemment, de nouveaux composés ont été testés pour leur activité anti-parasitaire tel que des dérivés d'aminophénylhydroxamate et d'aminobenzylhydroxamate (122,123), le nullsript (124) et le panobinostat. Ce dernier est un acide hydroxamique cinnamique qui a démontré une activité d'inhibition de la croissance des tachyzoïtes dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien des souris (125). Le SAHA et le Scriptaid ont montré une meilleure sélectivité vis-à-vis des parasites que la trichostatine A (120). De faibles concentrations de la trichostatine A, le SAHA et le Scriptaid (1 à 50 nM) ont eu un effet suppresseur sur l'infectivité des tachyzoïtes de *T. gondii*. (Tableau 3)



Le radical hydroxamate est un site d'instabilité métabolique potentielle (126,127), et elle est susceptible de chélater d'autres protéines contenant du zinc ou d'autres ions métalliques *in vivo*, entraînant un risque de toxicité tels que ceux observés pour les inhibiteurs de métallo-protéases matricielles contenant de l'hydroxamate.

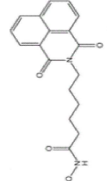
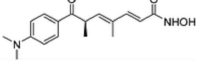
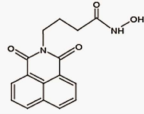
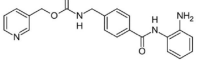
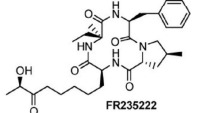
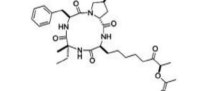
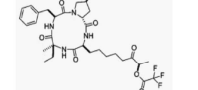
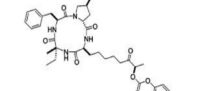
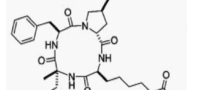
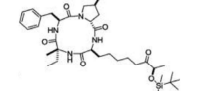
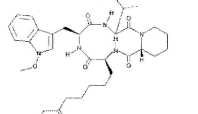
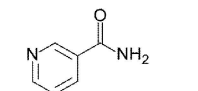
2.2.2.5.2 Inhibiteurs des histones acétyl-transférase (HATs) :

Actuellement, une seule molécule inhibitrice d'histone acétyl-transférase a démontré un effet significatif sur *T. gondii*.

Le fruit de kokum (*Garcinia indica*) est originaire d'Inde et est largement utilisé à des fins pharmaceutiques et industrielles. Un dérivé de benzophénone-poly-isoprényle extrait de ce fruit (le garcinol) est un inhibiteur de HAT (Histone Acétyl Transférase) dirigé contre TgGCN5b (128). L'exposition au Garcinol induit une diminution de la transcription des gènes régulés par TgGCN5b avec une CE₅₀ *in vitro* de 1,8µM.

Un autre composé considéré au départ comme un inhibiteur de l'histone acétyl-transférase GCN5, le MC1626, dérivé de quinoléine, a été testé sur *T. gondii* et s'est révélé actif contre le parasite *in vitro*. Cependant, les auteurs ont démontré que le composé était incapable d'inhiber le HAT du parasite et n'avait aucun impact sur cette activité. Les expériences ont montré que cette quinoléine cible l'apicoplaste du parasite malgré sa structure chimique proche des iHAT (129).(130)

Composés de base Hydroxamate :		IC50 (nM)	Index de sélectivité	Classe d'HDAC	Cellules infectées <i>In Vitro</i>	Effets notables sur <i>T.gondii</i>	Publication	
Panobinostat (LBH589)		424,41 ± 48,7 (RH)	19,62	I/II/IV	cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien	inhibition de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Zhang et al., 2022)	(125)
ST3 (dérivés d'aminophénylhydroxamate et d'aminobenzylhydroxamate)		>>50000	>400	I/II	HFF	inhibition faible de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Loeuillet et al., 2018)	(123)
345 (dérivés d'aminophénylhydroxamate et d'aminobenzylhydroxamate)		5000 ± 1000	58,3 ± 1,2		HFF	inhibition de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Loeuillet et al., 2018)	(123)
349 (dérivés d'aminophénylhydroxamate et d'aminobenzylhydroxamate)		>>50000	>400		HFF	inhibition faible de la prolifération et de l'activité des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Loeuillet et al., 2018)	(123)
350 (dérivés d'aminophénylhydroxamate et d'aminobenzylhydroxamate)		4000 ± 1000	300,0 ± 50,0		HFF	inhibition de la prolifération et de l'activité des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Loeuillet et al., 2018)	(123)
351 (dérivés d'aminophénylhydroxamate et d'aminobenzylhydroxamate)		>>50000	116,5 ± 3		HFF	inhibition faible de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Loeuillet et al., 2018)	(123)
360 (dérivés d'aminophénylhydroxamate et d'aminobenzylhydroxamate)		4900 ± 150	22,6 ± 9,5		HFF	inhibition de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Loeuillet et al., 2018)	(123)
361 (dérivés d'aminophénylhydroxamate et d'aminobenzylhydroxamate)		>>50000	25,0 ± 4,0		HFF	inhibition faible de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Loeuillet et al., 2018)	(123)
362 (dérivés d'aminophénylhydroxamate et d'aminobenzylhydroxamate)		52500 ± 10400	>400		HFF	inhibition faible de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Loeuillet et al., 2018)	(123)
363 (JF363; dérivés d'aminophénylhydroxamate et d'aminobenzylhydroxamate)		560 ± 50 (RH)	105 ± 10,5		HFF	inhibition de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i> . Diminue le nombre de kystes in vivo (dose 40 et 160 mg/kg).	(Loeuillet et al., 2018) (Jubllet et al., 2022)	(130, 122, 123)
		270 ± 20 (prugniaud)	218 ± 21,8		HFF	décalage dans la mortalité après injection d'une dose létale de parasites	(Loeuillet et al., 2018)	(123)
Tubastatine A (TST)		19 ± 1 (24H) 520 ± 386 (48H) Sur RH	39 ± 11	I/II	Cellules épithéliales LLC-MK2	inhibition de la prolifération et de l'activité des tachyzoïtes <i>T. gondii</i> , altération du bourgeonnement des cellules filles, hyperacétylation H4, ipoacétylation H3	(Araujo-Silva et al., 2021)	(121)
Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA ou Vorinostat)		41 ± 3 (24H) 67 ± 36 (48H) Sur RH	30 ± 4	I/II	Cellules épithéliales LLC-MK3	inhibition de la prolifération et de l'activité des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Araujo-Silva et al., 2021)	(121)
		83 ± 4 (RH)	4,8		Fibroblastes Hs68	inhibition de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Strobl et al., 2007)	(120)
bishydroxamique subérique acid (SBHA)		213 ± 110 (RH)	5,7	I/II	Fibroblastes Hs68	inhibition de la prolifération et de l'activité des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Strobl et al., 2007)	(120)

Scriptaid		39 ± 11 (RH)	4,3	I/II	Fibroblastes Hs68	inhibition de la prolifération et de l'activité des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Strobl et al., 2007)	(120)	
Trichostatine (TSA)		41 ± 1 (RH)	5,8	I/II	Fibroblastes Hs68	inhibition de la prolifération et de l'activité des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Strobl et al., 2007)	(120)	
Nullscript		50900 ± 4300	ND	I/II	HFF	inhibition faible de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Murakoshi et al., 2020)	(124)	
MS-275		ND	ND	I/II	macrophages	L'inhibition de l'HDAC à l'aide de l'inhibiteur MS-275 abolit le complexe d'histocompatibilité majeur de classe II régulé par l'IFN-γ défectueux dans les macrophages infectés par <i>T. gondii</i> . Ne permet pas de guérir	(Sumpf et al., 2017)	(130)	
Composés de base tétrapeptide cyclique :									
FR235222 (tétrapeptide cyclique)		7,6 ± 0,6 (RH)	13,2	I (TgHDAC3)	HFF	induit la différenciation du stade tachyzoïte en stade bradyzoïte, influence l'expression d'environ 370 gènes, dont un tiers sont exprimés de manière spécifique au stade	(Bougourd et al., 2009)	(116)	
		10 ± 1 (Prugniaud)	12,79	I (TgHDAC3)	HFF	FR235222 est capable de traverser la paroi kystique pour perturber l'activité des bradyzoïtes <i>In Vivo</i> et <i>In Vitro</i>	(Maubon et al., 2010)	(117)	
W363 (tétrapeptide cyclique dérivé de FR235222)		10,2 (RH)	63,21	I/II	HFF	inhibition de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i> , Meilleur index de sélectivité que FR235222	(Maubon et al., 2010)	(117)	
W371 (tétrapeptide cyclique dérivé de FR235222)		19,37 (RH)	19,9	I/II	HFF	inhibition de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Maubon et al., 2010)	(117)	
W399 (tétrapeptide cyclique dérivé de FR235222)		11,3 (RH)	47,7	I/II	HFF	inhibition de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i> , Meilleur index de sélectivité que FR235222	(Maubon et al., 2010)	(117)	
W406 (tétrapeptide cyclique dérivé de FR235222)		95,3 (RH)	NC (IC50>2000 sur HFF)	I/II	HFF	inhibition de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Maubon et al., 2010)	(117)	
W425 (tétrapeptide cyclique dérivé de FR235222)		ND	ND	I/II	HFF		(Maubon et al., 2010)	(117)	
Apicidine		15 ± 2	11	I/II	HFF	inhibition de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Bougourd et al., 2009)	(116)	
Nicotinamide		>50000 (RH)	ND	III	Fibroblastes Hs68	inhibition faible de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Strobl et al., 2007)	(120)	

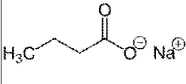
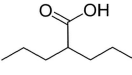
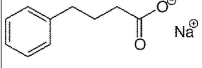
inhibiteur de base acide gras à chaîne courte :								
Sodium butyrate		1000 ± 455 (RH)	4,2	III	Fibroblastes Hs68	inhibition faible de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Strobl et al., 2007)	(120)
Valproïque acid		450	ND	I/II	HFF	inhibition de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Jones-Brando et al., 2003)	(119)
		1600 ± 1116 (RH)	5,2		Fibroblastes Hs68		(Strobl et al., 2007)	(120)
inhibiteur de base acide gras aromatique à chaîne courte :								
4-phenylbutyrate		5350 ± 2750 (RH)	3,1	III	Fibroblastes Hs68	inhibition faible de la prolifération des tachyzoïtes <i>T. gondii</i>	(Strobl et al., 2007)	(120)

Tableau 3. Liste récapitulative des inhibiteurs d'HDAC testés sur *T. gondii*

2.2.2.2.5.3 Inhibiteurs des bromodomains :

Le bromodomaine est un module "lecteur" des lysines acétylées, liant la lysine acétylée et initiant la signalisation en aval par le recrutement d'autres protéines (131). Diverses protéines parasitaires présentant un bromodomaine ont été identifiées chez *T. gondii* (132–134).

Deux inhibiteurs (I-BET151 et F3215-0002) des bromodomains ont été testés sur *T. gondii*. Ces composés ont permis d'identifier une protéine parasitaire impliquée dans la résistance aux inhibiteurs de bromodomaine : TgPRELID (132). Les protéines contenant le domaine PRELI chez l'Homme et la levure sont impliquées dans le transfert de phospholipides à travers les membranes mitochondriales pour maintenir la composition lipidique appropriée de la membrane mitochondriale. Les auteurs ont montré que TgPRELID présente une localisation mitochondriale et établi l'hypothèse que TgPRELID soit impliqué dans le processus de résistance multi-drogues. La résistance de *T. gondii* vis-à-vis des inhibiteurs de bromodomains se trouve fortement diminuée en l'absence de TgPRELID. TgPRELID semble se lier avec divers composés inhibiteurs de bromodomains bien que présentant des structures chimiques très différentes.

GCN5b présente également un bromodomaine et est essentielle au parasite en phase proliférative. L'inhibiteur de bromodomaine L-Moses se lie au bromodomaine de GCN5b et induit une inhibition de la prolifération du tachyzoïte (133).

Actuellement, et malgré de nombreuses recherches et la découverte de nouvelles molécules et cibles thérapeutiques, aucune molécule ne présente un gain assez important pour pouvoir remplacer le traitement historique en dépit de ses effets secondaires. De nouveaux composés efficaces contre les kystes sont pourtant nécessaires afin de pouvoir maîtriser les conséquences de la toxoplasmose chez l'Homme. Afin de pouvoir mener ces recherches, le développement de nouveaux outils techniques permettant l'étude des kystes quiescents apparaît comme une nécessité. Ces protocoles devront permettre de caractériser les voies métaboliques spécifiques de chaque stade, au fur et à mesure de chaque étape de la différenciation du tachyzoïte au bradyzoïte et du bradyzoïte au tachyzoïte, et d'axer la recherche de nouveaux composés inhibiteurs sur ces voies.

3 *Ultrastructure, cycle cellulaire et régulation des gènes chez T. gondii*

3.1 *Ultrastructure et organelles*

3.1.1 *Ultrastructure du tachyzoïte*

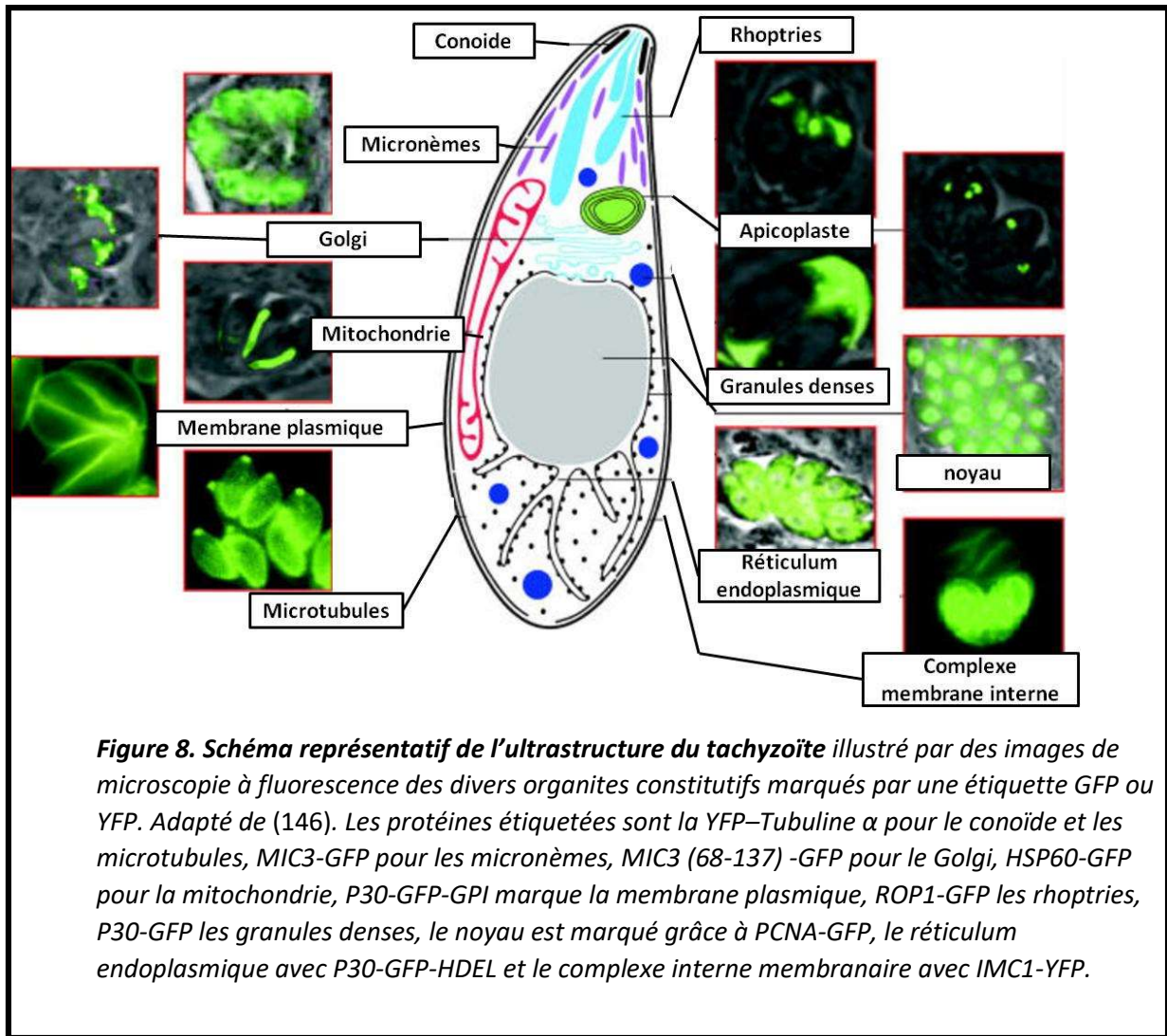
Le tachyzoïte se présente sous une forme arquée, de 7µm de long sur 2µm de large environ. Il possède un génome haploïde de 63 Mb sur 13 chromosomes. Le génome de *T. gondii* a longtemps été décrit réparti sur 14 chromosomes (135,136). Cependant, des travaux récents ont démontré une fusion entre les chromosomes nommés à l'origine VIIb et VIII, réduisant le caryotype de *N. caninum* et de *T. gondii* à 13 chromosomes (137). *T. gondii* est constitué d'organites communs à toute cellule eucaryote tels qu'un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, une mitochondrie, des ribosomes et une membrane plasmique. Mais il présente également des organites sécrétoires spécifiques de son phylum nommés rhoptries, micronèmes et granules denses ainsi qu'un apicoplaste (hérité de l'internalisation d'un plaste chlorophyllien dans son évolution). Ces organites font de *T. gondii* une cellule eucaryote hautement différenciée avec une structure orientée très organisée (Figure 8). Enfin, un cytosquelette cortical constitué d'un réseau de microtubules entouré d'un complexe membranaire appelé pellicule permet de structurer cet ensemble (figure 9).

3.1.1.1 *Le cytosquelette cortical*

3.1.1.1.1 *La pellicule*

La structure délimitant le parasite est appelée pellicule, elle mesure 60 nm d'épaisseur et est constituée d'une membrane plasmique externe (plasmalemma) et de deux membranes internes formant un complexe membranaire interne appelé IMC (Inner Membrane Complex) entourant le parasite (138). Ce complexe membranaire joue un rôle d'échange essentiel au cycle parasitaire durant les étapes d'attachement, d'invasion, et de prolifération (139).

La membrane plasmique du parasite correspond à la membrane externe. Elle est constituée d'une bicouche de phospholipides recouverte de groupements glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI) dans lesquels sont ancrées des glycoprotéines de surface SAG (antigène de surface) (140,141). Ces protéines sont essentielles dans la reconnaissance de la cellule hôte, l'adhésion, ainsi que la modulation de la virulence et la réponse immunitaire (142,143)(144,145).





Légende

NU: Noyau parasite

Mt: mitochondrie

DG: granule dense

ER: réticulum endoplasmique

IMC: complexe membranaire interne

PV: vacuole parasitophore

PM: membrane parasitaire

GO: appareil de golgi

AP: apicoplaste

MN: micronème

RH: rhoptrie

CO: conoïd

PVM: membrane de la vacuole parasitophore

HC: cellule hôte

HC-MT: mitochondrie de la cellule hôte

HC-ER: réticulum endoplasmique de la cellule hôte

Figure 9. Image annotée de microscopie électronique d'une vacuole parasitophore

*Vacuole intracellulaire contenant deux parasites de *T. gondii* dans une cellule humaine. Issue de (146).*

Le complexe membranaire interne (IMC) est commun à tous les organismes du groupe Alveolata. D'une épaisseur de 15nm, il est constitué des 2 membranes internes et entoure le corps du parasite sur la quasi-totalité à l'exception des pôles cortical et basal et du micropore. Le micropore est une invagination de la membrane, recouvert de clathrine et situé à mi-hauteur du corps du parasite et correspond à un site potentiel d'endocytose (147). L'IMC se compose de citernes membranaires soutenues par un cytosquelette sous-membranaire. L'IMC confère la structure au parasite, et la partie apicale contribue directement aux fonctions sécrétrices du complexe apical (figure 10).

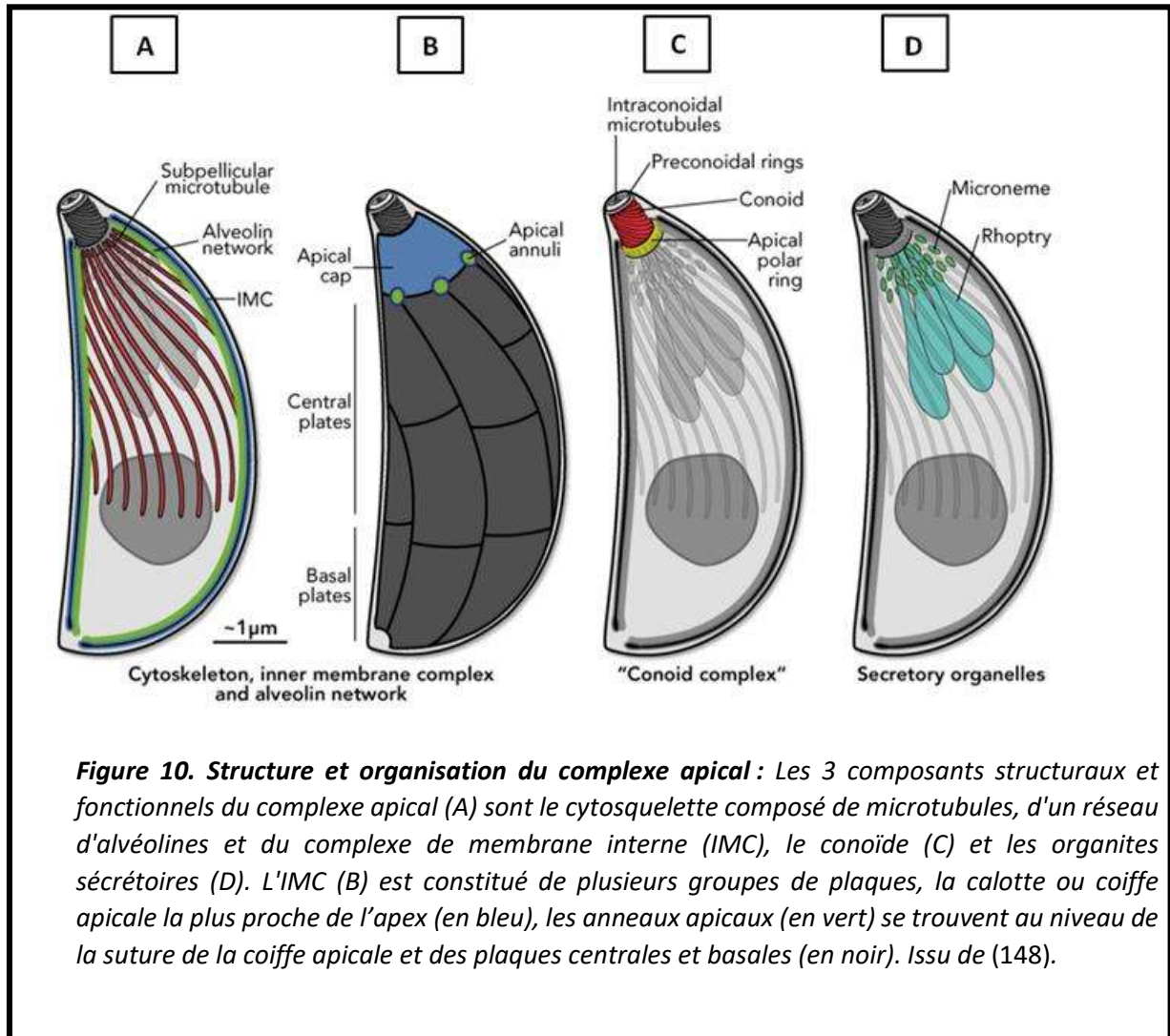
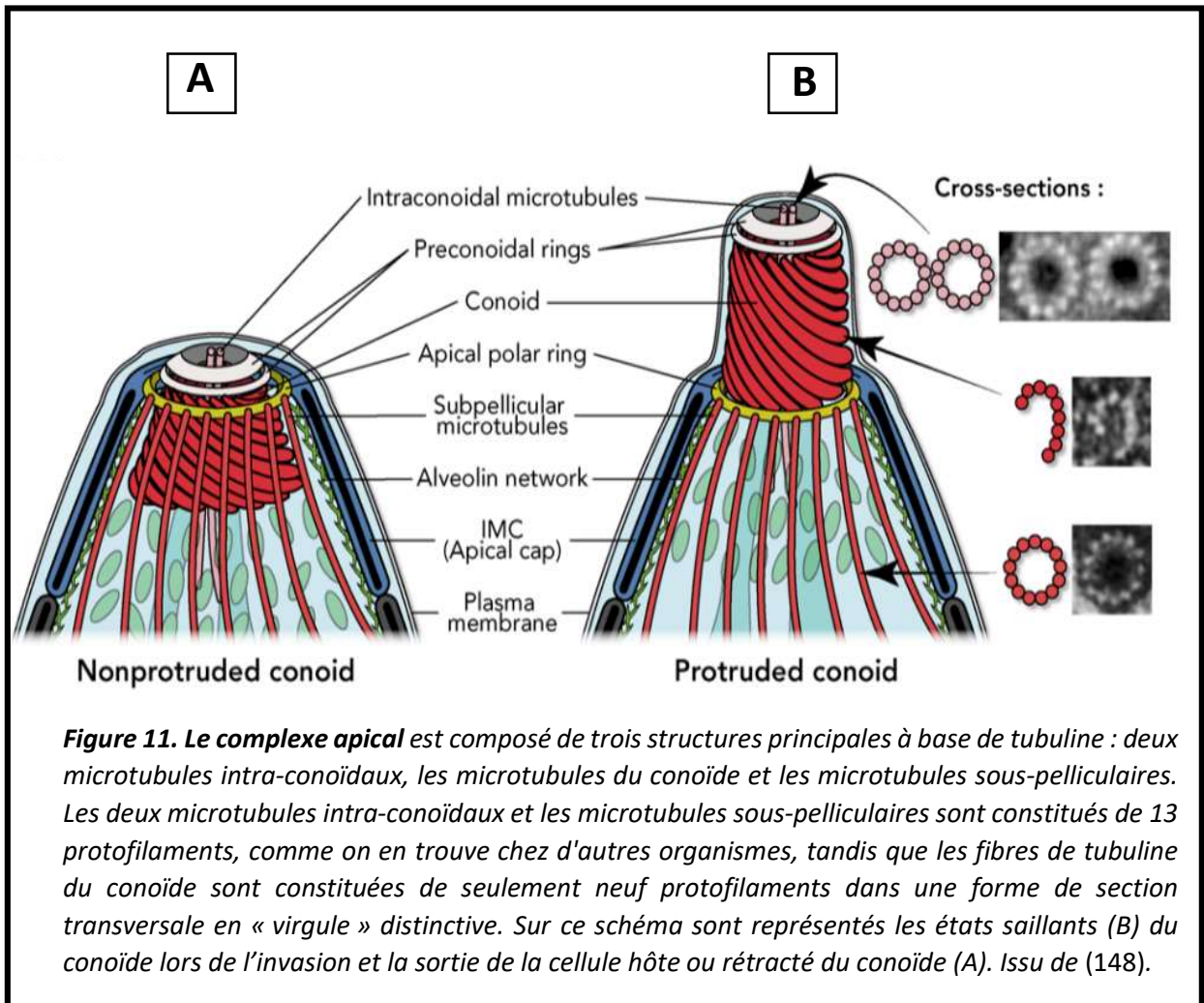


Figure 10. Structure et organisation du complexe apical : Les 3 composants structuraux et fonctionnels du complexe apical (A) sont le cytosquelette composé de microtubules, d'un réseau d'alvéolines et du complexe de membrane interne (IMC), le conoïde (C) et les organites sécrétrices (D). L'IMC (B) est constitué de plusieurs groupes de plaques, la calotte ou coiffe apicale la plus proche de l'apex (en bleu), les anneaux apicaux (en vert) se trouvent au niveau de la suture de la coiffe apicale et des plaques centrales et basales (en noir). Issu de (148).

3.1.1.1.2 Le conoïde et le réseau microtubulaire

Le conoïde est constitué de 10 à 14 filaments de tubulines polymérisées en forme de cylindre (149,150) lui conférant la capacité de s'étendre et se rétracter au niveau du complexe apical. Deux anneaux pré-conoïdaux (au-dessus du conoïde) et un anneau polaire apical (sous le conoïde) enserrant deux microtubules intra-conoïdaux de 400nm en leur centre. Étroitement liés aux organites sécrétrices spécifiques (figure 11), ces microtubules intra-conoïdaux semblent être un support permettant la décharge des protéines de rhoptries et de micronèmes durant l'invasion (148,151).



3.1.2 Les organites spécifiques

3.1.2.1 L'apicoplaste

L'apicoplaste est un organite possédant son propre ADN extranucléaire (comme la mitochondrie) de 35kb codant pour environ 60 gènes. Il est commun à de nombreux apicomplexes tel que *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium* mais absent chez d'autres comme *Cryptosporidium*. L'apicoplaste est délimité par quatre membranes. En effet, il résulte de l'internalisation secondaire d'une cyanobactérie par une algue rouge, puis de l'algue rouge par un ancêtre des apicomplexes. La majorité des protéines le constituant est codée par l'ADN nucléaire puis exportée post-traduction. Bien qu'ayant perdu son activité photosynthétique, l'apicoplaste reste le siège de nombreuses voies de biosynthèses essentielles au parasite telles que la synthèse des acides gras par le système FASII (Fatty Acid Synthesis type II), la synthèse de l'hème et des isoprénoïdes. L'apicoplaste constitue une des cibles thérapeutiques majeures dans le développement de nouveaux composés antiparasitaires de par l'existence des voies précédemment citées de biosynthèses essentielles à la survie du parasite et distinctes de leurs homologues eucaryotes (152).

3.1.2.2 Les organites sécrétoires :

Les organites sécrétoires apicales sont essentielles pour l'invasion et la sortie des zoïtes apicomplexes envahissants tel que *T. gondii* :

Les micronèmes sécrètent les adhésines nécessaires au glissement (la motilité du parasite) et l'invasion, ainsi que les perforines et les protéases nécessaires à la sortie des parasites des cellules hôtes infectées (148). Elles sont situées au-dessous du conoïde et traversent ce dernier lors de l'exocytose (153). Les micronèmes se présentent sous la forme de bâtonnets de 200 x 50nm. Leur nombre est variable en fonction de la souche parasitaire ou du stade observé (154). Chez le tachyzoïte, on en trouve une centaine. L'invasion de la cellule hôte est réalisée grâce à une sécrétion successive de protéines issues des micronèmes dont les protéines MIC font partie (151). Les protéines MIC sont impliquées dans plusieurs mécanismes essentiels à l'infection par le parasite comme l'attachement, la formation de la jonction mobile, l'invasion(155–158) et le phénomène de motilité par glissement (le «gliding») (159).

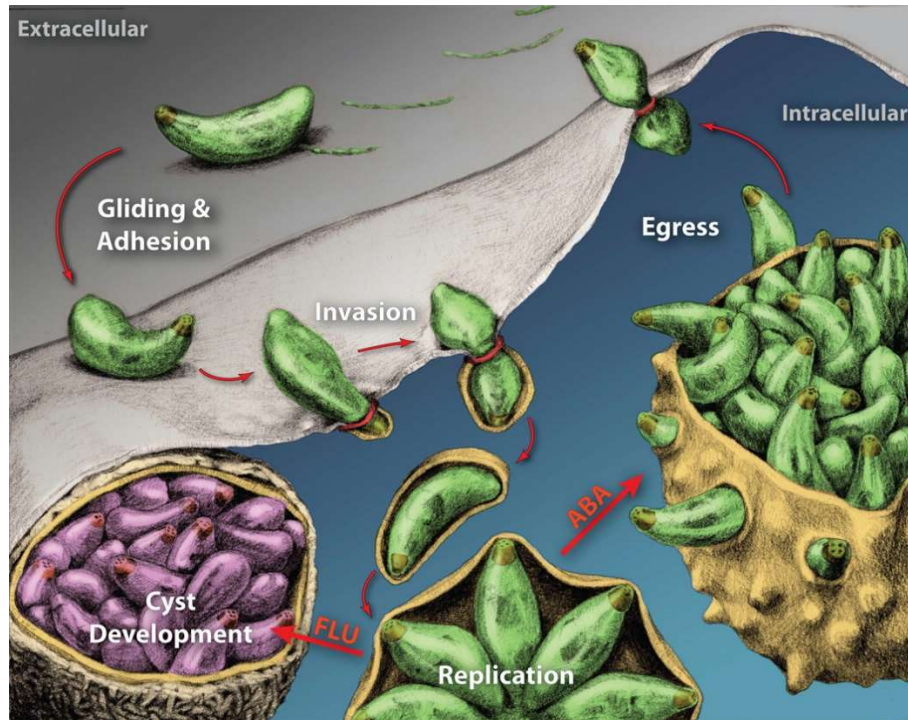
Les rhoptries sont de gros organites sécrétoires situés à l'apex du parasite. Le tachyzoïte possède entre 6 et 12 rhoptries qui présentent une base en forme de bulbe et d'un cou effilé vers l'apex (2-3µm x 0,2 µm). Les protéines de rhoptries jouent un rôle dans l'établissement de la vacuole parasitophore et sont impliquées dans le détournement et le contrôle de certaines fonctions biologiques de l'hôte. Elles sont aussi impliquées durant le processus d'invasion. Les rhoptries du col (rhoptry neck proteins ou RON) forment un complexe impliqué dans la formation de la jonction mobile au point de contact des membranes plasmiques du parasite et de la cellule hôte au travers de laquelle le parasite pénètre dans la cellule (160).

Les granules denses se présentent sous forme d'organites sphériques de 200nm de diamètre dense aux électrons en microscopie électronique. On dénombre environ 15 granules denses réparties dans l'ensemble du cytoplasme du parasite. Actuellement, 60 protéines GRA ont été identifiées (protéines de granules denses) (161). Elles sont sécrétées dans la vacuole parasitophore et au-delà (151). Les protéines de granules denses sont impliquées dans la maturation de la vacuole parasitophore, dans le recrutement de ressources au sein de la cellule hôte ou dans la modulation de la réponse immune de l'hôte.

3.1.3 Le cycle lytique

Le cycle lytique (Figure 12) peut-être divisé en 4 étapes successives :

- L'invasion de la cellule hôte permise par la motilité du parasite par glissement ou « gliding » qui est également essentielle à la dissémination du parasite. Le "gliding" est très conservé chez les Apicomplexes et se caractérise par trois formes de déplacements: circulaire (circular gliding), hélicoïdale (helical glinding) et en spirale (twirling) (162). Les protéines des micronèmes jouent un rôle essentiel dans ce processus (163).
- la formation de la vacuole parasitophore résulte de l'invagination de la membrane de la cellule hôte (164) qui sera modifiée par le parasite par inclusion des protéines transmembranaires et des protéines associées aux lipides Raft à l'exception des protéines à ancre GPI (162,165). Toutes ces modifications permettent d'échapper à la voie endosomale et donc de protéger la vacuole de la dégradation par les lysosomes.
- La réplication au sein de cette vacuole
- La sortie active des parasites provoquant la lyse de la cellule infectée.



Cycle lytique de *T. gondii* adapté de (166)

Figure 12. Le parasite extracellulaire très mobile s'attache à la membrane de la cellule. La décharge du contenu de ces rhoptries, micronèmes et granules denses va permettre la constitution de la jonction mobile (anneau rouge) par laquelle le parasite va envahir la cellule hôte. Lors de celle-ci, se forme la vacuole parasitophore dans laquelle le parasite va se répliquer. Au terme de plusieurs divisions, la sortie des parasites est déclenchée afin de permettre une dissémination et l'invasion d'autres cellules. L'infection de cellules au sein d'environnements immunitairement privilégiés tel le cerveau ou les muscles aboutit à une conversion spontanée du parasite vers la forme enkystée. En culture cellulaire, l'accumulation artificiel d'acide abscissique (ABA) est déclencheur de la sortie du parasite de la cellule hôte. L'hormone de plante fluridone (FLU) bloque l'action d'ABA et empêche la sortie du parasite, ce qui induit la formation d'un kyste.

3.2 Cycle cellulaire et répliation du parasite

3.2.1 Un cycle cellulaire inhabituel

Le tachyzoïte se réplique par endodyogénie. Deux parasites filles se forment au sein du parasite parent dont le matériel biologique sera recyclé en fin de division (Figure 13A). En comparaison avec les eucaryotes supérieurs, l'ensemble des apicomplexes présente un cycle cellulaire atypique composé des phases G1, S et M mais sans apparente phase G2 (167). Le génome haploïde (1N) du parasite est répliqué durant la phase S (caryocinèse). Au cours de cette phase, le parasite marque une pause dans cette répliation (1,8N) durant laquelle commence la formation des fuseaux mitotiques (cytokinèse) (163). La division cellulaire est sous le contrôle du système cyclines/Cdks (Kinase dépendante des cyclines) (168–

170). *T. gondii* code dans son génome sept cyclines atypiques de type P, H, Y et L et dix Crk (Cdk related kinase) qui jouent un rôle dans la régulation des processus cellulaires dont 5 impliquées directement dans le processus de division cellulaire. Alvares *et al.* (168) ont montré que le complexe TgCrk1/TgCycl est essentiel pour la formation des cellules filles. TgCrk2 en interaction avec TgPHO80 (cycline de type P), empêche un arrêt du cycle en phase G1. TgCrk5 régule un point de contrôle en phase S alors que TgCrk4 et TgCrk6 n'interagissant pas avec des cyclines, sont impliquées dans la duplication du centrosome et la fonction des fuseaux mitotiques, respectivement (Figure 13B). Plus récemment, le complexe TgCrk6/TgCyc1 a été décrit comme régulant la métaphase chez *T. gondii* en contrôlant spécifiquement le fuseau mitotique associé au centromère (171).

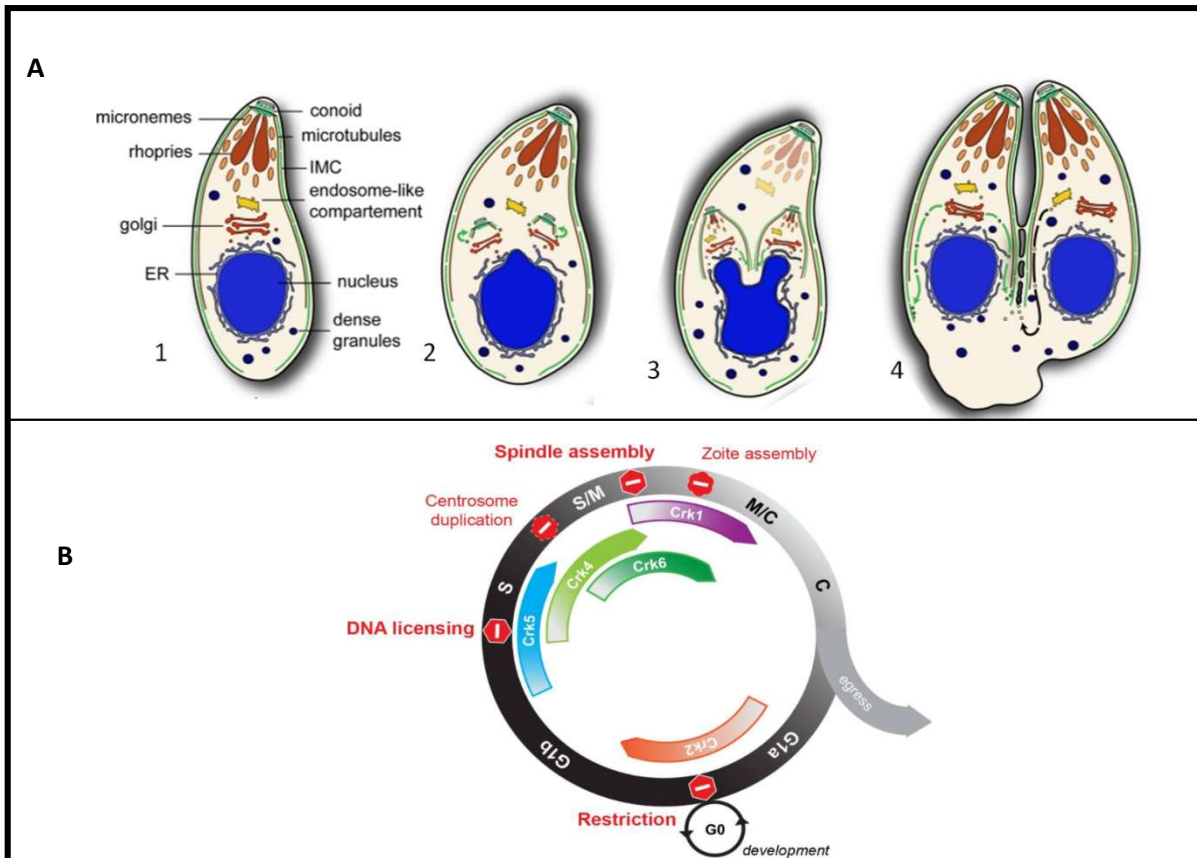


Figure 13.

A- Représentation de la réplication du parasite par endodyogonie adapté de (172)
 B- Représentation des points de contrôle au cours du cycle cellulaire du tachyzoïte (168). Un premier point de contrôle en G1 dépend du complexe TgCrk2-TgPHO80 (flèche orange). La protéine TgCrk5 (flèche bleue) régule le passage de la phase G1 à la phase S et l'initiation de la réplication. TgCrk6 est impliqué dans la régulation de la formation des fuseaux mitotiques durant la métaphase (flèche vert foncé). Deux autres points de contrôles spécifiques aux Apicomplexes sont sous la régulation de TgCrk4 (flèche vert clair) nécessaire à la maintenance de la stœchiométrie des centrosomes et TgCrk1 (flèche violette) contrôlant la formation des cellules filles.

3.3 La transcription

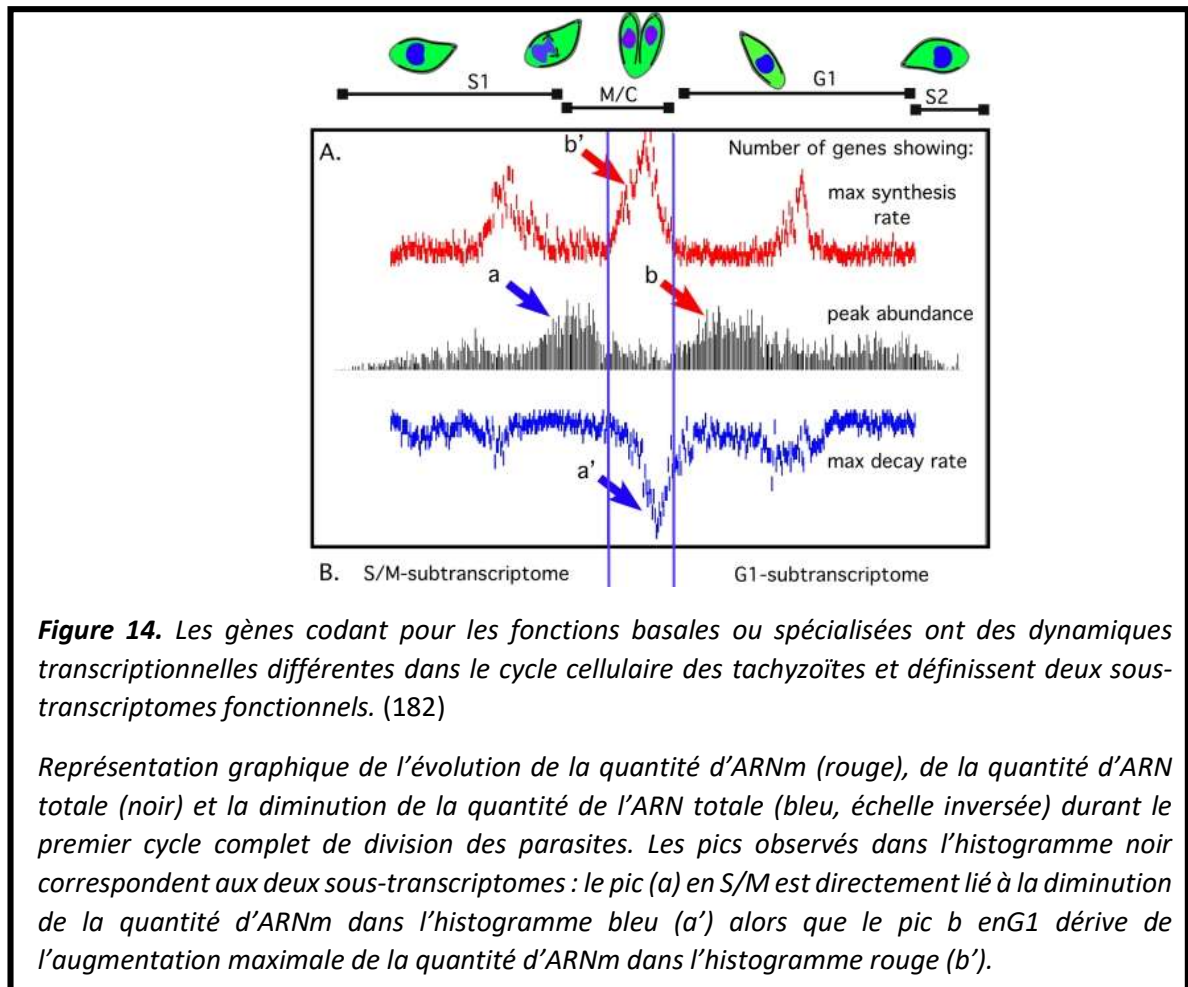
L'infection d'organismes intermédiaires, de types cellulaires multiples ainsi que le passage par divers stades parasitaires au sein d'un cycle cellulaire complexe impliquent des changements biologiques majeurs qui imposent une régulation fine de l'expression des gènes chez le parasite. De façon générale, la transcription est un mécanisme critique permettant l'expression des gènes chez les eucaryotes. Ce mécanisme est conservé au cours de l'évolution et est assuré par un complexe protéique composé de l'ARN polymérase II et de facteurs de transcription dit généraux (173).

3.3.1.1 *La transcription chez Toxoplasma*

Le mécanisme global de la transcription chez les eucaryotes peut se décomposer en différentes phases impliquant des acteurs variés et nombreux. La fixation d'activateurs de transcription sur la région régulatrice du promoteur est la première étape qui va permettre le recrutement des enzymes de remodelage de la chromatine et de modification des histones. Les modifications ainsi orchestrées vont permettre un environnement favorable au démarrage de la transcription par ouverture de la chaîne d'ADN et fixation du complexe de pré-initiation composé d'un complexe médiateur, de facteurs de transcription généraux et de l'ARN polymérase II (174). Enfin, chaque promoteur se caractérise par la présence d'une région génomique appelée CPE (Core Promoter Element) composées de plusieurs éléments comme des sites de fixation d'éléments cis-régulateurs de type boîte TATA ou site de fixation de facteurs de transcription (175,176).

Chez les apicomplexes, les éléments et mécanismes régulateurs de la transcription sont encore peu connus. Cependant, des homologues des trois ARN polymérases, l'ARN polymérase I pour la transcription d'ARN ribosomiaux (ARNr), l'ARN polymérase II responsable de la transcription des ARN messagers (ARNm) codant les protéines et l'ARN polymérase III pour la transcription de petits ARN comme les ARN de transfert (ARNt) ont été retrouvés dans les génomes de *P. falciparum* et *T. gondii* (177). Certains éléments cis-régulateurs généraux de type boîte TATA ou CAAT et facteurs associés qui permettent le recrutement du complexe polymérase II aux promoteurs ont été récemment caractérisés (178,179). De plus, des homologues fonctionnels TBP (TATA Binding Protein) ont été identifiés par Immuno-Précipitation de la chromatine (ChiP pour Chromatin Immuno-Precipitation) par l'équipe du Dr Hakimi et déposées sur la base de données ToxoDB (toxodb.org). Des motifs de fixation d'éléments régulateurs spécifiques ont été identifiés sur les promoteurs de gènes régulés au cours de la différenciation (TGTGTG, CAGC et TACTGG), ce qui implique une organisation des éléments régulateurs de la transcription chez *T. gondii* similaire au reste des eucaryotes supérieurs. Ces éléments ont été considérés non conventionnels par le passé (177), avant d'être de nouveau étudiés suite à la découverte de nouveaux motifs et de leur caractérisation (180,181). Les promoteurs de 16 gènes spécifiques aux bradyzoïtes ont été cartographiés, ce qui a conduit à l'identification de motifs qui semblent être spécifiques de gènes induits lors de la différenciation. Ces éléments des deux gènes *bag1* et *B-NTPase* spécifiques aux bradyzoïtes ont été insérés dans le promoteur constitutif DHFR-TS et l'ont converti en un promoteur qui améliore l'expression d'un rapporteur dans des conditions favorisant l'induction de la différenciation (180,181). Cette expérience démontre que l'expression spécifique de stade de certains gènes est directement sous le contrôle de ces cis-éléments contenus dans les promoteurs de ces gènes.

L'expression des gènes de tachyzoïtes est finement régulée de manière dépendante du cycle cellulaire pour un tiers des gènes (182). Les auteurs ont montré que l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans les fonctions biosynthétiques et métaboliques, similaires à la plupart des eucaryotes, sont exprimés en phase G1 alors que les gènes impliqués dans la maturation du parasite, le développement d'organites spécialisés et la sortie des cellules filles sont exprimés en phases S et M (Figure 14). Chez *T. gondii*, l'expression des transcrits dépendants du cycle cellulaire est donc réalisée au moment même du besoin de la protéine codée. Cette dynamique de régulation appelée «juste à temps» implique un contrôle fin de l'expression des transcrits au cours du cycle cellulaire (183).



Une étude réalisée au cours de la différenciation de tachyzoïte à bradyzoïte, grâce à des puces à ADN, a montré que l'expression des ARNm est en corrélation directe avec l'expression de protéines spécifiques de bradyzoïte connues et montre une activation hiérarchique des gènes impliqués dans la conversion du stade tachyzoïte vers bradyzoïte (184–186). Cette expression hiérarchique a été récemment vérifiée par une étude en « single cell » permettant d'observer l'expression des gènes au cours du cycle cellulaire et de la différenciation tachyzoïte-bradyzoïte (187).

3.3.1.2 Les facteurs de transcription chez *T. gondii*

Chez les eucaryotes, les facteurs de transcription représentent un des piliers de la régulation des gènes. Ils sont caractérisés par leur domaine de liaison à l'ADN qui permet de les classer en diverses grandes familles tel que les domaines homeo, Forkhead (Fkh), Bright (ARID), ou MYB faisant partie des domaines "helix-turn-helix" (HTH), les facteurs chélatant le zinc comme les 'doigts de zinc' (zinc Finger) C2H2, ceux présentant un repliement hélicoïdal (HMG, bZip et bHLH) ou encore des repliements plus complexes comme des domaines VP1 ou AP2.

Les premières recherches de ces protéines dans le génome des Apicomplexes ont mis en évidence une étonnante pénurie en plusieurs familles de facteurs de transcription (188,189) comblée par une grande diversité de facteurs de transcription d'une même famille, les protéines APETALA-2 (AP2). Les facteurs de transcription de type AP2 sont retrouvés chez les plantes et sont capables d'interagir avec l'ADN (188,190). Le rôle des APETALA2 est de permettre le recrutement des ARN polymérases et de leurs facteurs généraux sur des séquences cis en amont du site d'initiation permettant ainsi l'expression des gènes (191). L'internalisation par endosymbiose d'un plaste non-chlorophyllien dans l'histoire évolutive de ces parasites pourrait permettre d'expliquer la présence de cette famille de facteurs de transcription chez les Apicomplexes et en font des cibles thérapeutiques de choix de par l'absence de ce type de protéines chez les hôtes de *T. gondii* (192).

Les protéines ApiAP2 présentent un domaine AP2 d'environ 60 acides-aminés. Bien qu'ayant un degré variable d'homologie de séquences avec ceux des plantes, Ils présentent la même structure secondaire. Ces facteurs de transcription contiennent d'un à quatre domaines AP2 pouvant également être associés à un petit motif de liaison à l'ADN nommé "AT-hook". Dans la littérature, ce motif est fréquemment associé à des domaines fonctionnels des protéines de la chromatine et des protéines de liaison à l'ADN (193). Certains ApiAP2 sont retrouvés en complexe avec d'autres facteurs responsables de modifications de la chromatine tels que TgGCN5-B (194) et TgCRC (195). De plus, TgHDAC3 forme un complexe avec la protéine MORC et des facteurs de transcription de type ApiAP2 (110). Les ApiAP2 sont donc des facteurs de transcription qui seraient capables de lier l'ADN et recruter les facteurs de remodelage et de modification de la chromatine.

T. gondii compte 68 protéines contenant au moins un domaine ApiAP2 : 24 sont exprimées durant le cycle cellulaire chez le tachyzoïte, 27 sont exprimées constitutivement, 11 sont exprimées chez le bradyzoïte et 6 semblent exprimées lors du cycle sexué (182,196,197).

Une autre famille de facteur de transcription d'importance est la famille contenant un domaine Myb. Ces facteurs de transcription sont composés de trois répétitions d'une cinquantaine d'acides aminés formant trois hélices alpha correspondant au domaine de fixation à l'ADN. D'après les données disponibles sur ToxoDB, sept protéines Myb semblent être codées chez *T. gondii*. Un facteur de transcription contenant un domaine Myb (BFD1) a été identifié comme un facteur majeur pour déclencher l'expression du profil spécifique lié à la différenciation du tachyzoïte vers le bradyzoïte (196). BFD1 lie les promoteurs de nombreux gènes spécifiques au stade enkysté et régule ainsi leur activité.

3.4 Le remodelage et les modifications de la chromatine chez *Toxoplasma* :

La modification de la chromatine joue un rôle important chez les eucaryotes dans la modulation du niveau de compaction du matériel génétique. Cette régulation permet une augmentation ou une diminution de l'accessibilité de l'ADN aux protéines chargées de lire et exprimer le code génétique. Cette régulation est appelée le code histone.

Pour se faire, l'ADN chromosomique des eucaryotes est structuré autour des nucléosomes qui sont des complexes macromoléculaires constitués de 147pb d'ADN enroulés autour d'un octamère d'histone (198). Chaque octamère est constitué de deux monomères de chaque histone (H2A, H2B, H3 et H4). L'histone H1, également appelé histone de liaison, est une protéine liée à l'ADN située entre 2 nucléosomes (Figure 15).

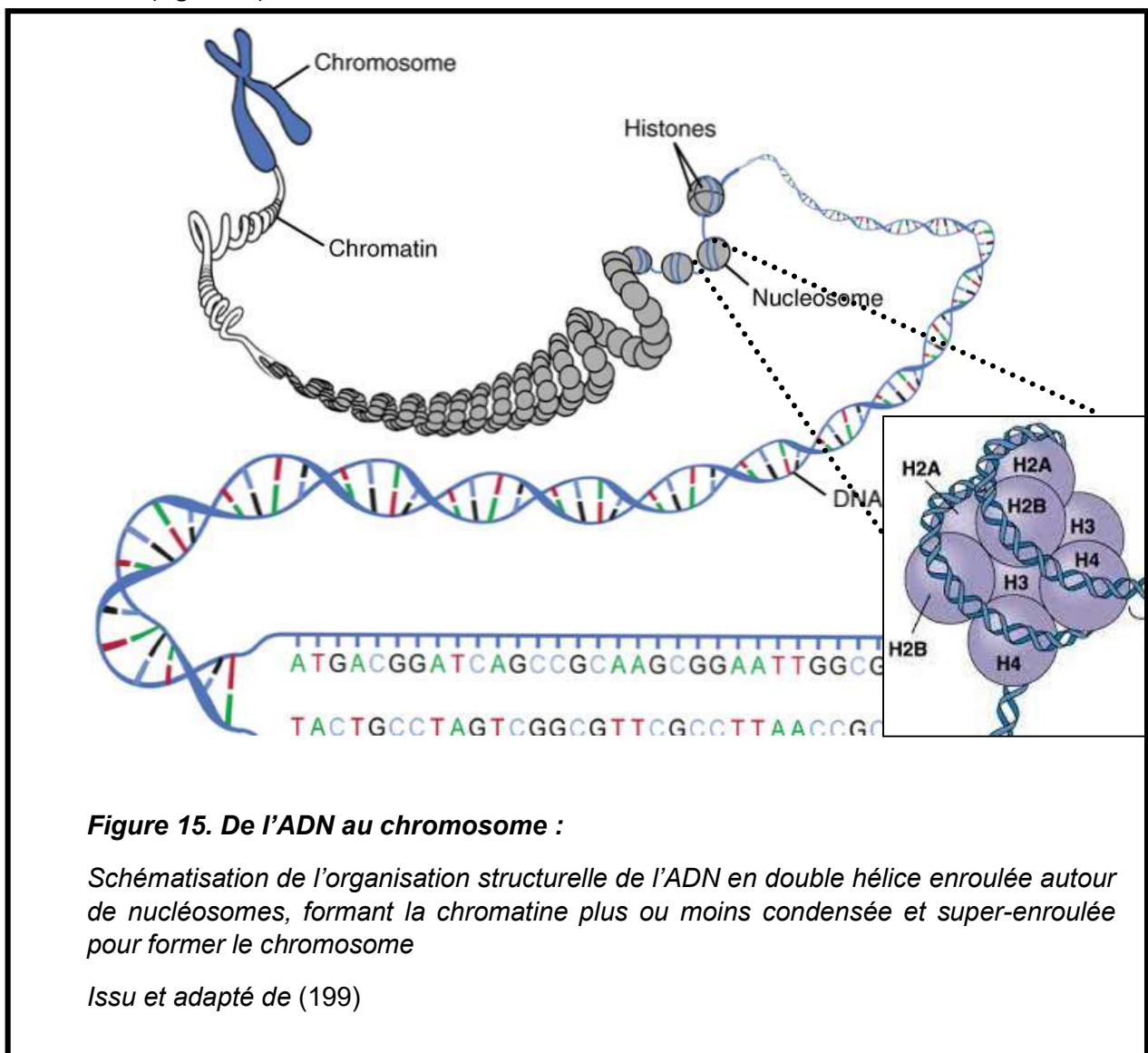


Figure 15. De l'ADN au chromosome :

Schématisation de l'organisation structurelle de l'ADN en double hélice enroulée autour de nucléosomes, formant la chromatine plus ou moins condensée et super-enroulée pour former le chromosome

Issu et adapté de (199)

3.4.1 Les histones:

T. gondii exprime quatre histones canoniques (H2A, H2B, H3 et H4), représentées par des gènes à copie unique, à l'exception de H2B qui est codée par deux gènes distincts sur des chromosomes différents (200,201). Cependant, ces deux gènes ne codent pas exactement pour la même protéine. En effet, H2Ba est principalement exprimée dans la forme tachyzoïte alors qu'H2Bb est caractéristique des formes sexuées (202). Les histones H2A et H2B de *T. gondii* présentent respectivement 79% et 75% de similarité avec l'Homme. Comme H4, l'histone H3 partage un degré élevé de similitude de séquences avec l'histone 3 humaine, différant de 8 acides aminés situés dans les domaines N-terminal et globulaire et étant un résidu plus long à l'extrémité C-terminale. Les différences sont concentrées dans les régions N et C-terminales pour H2A et N-terminales pour H2B. Ils partagent une structure commune composée d'un corps globulaire et d'une queue N-terminale pour H2B, H3 et H4 et C-terminal pour H2A localisée à l'extérieur du nucléosome et qui est sujette à de nombreuses modifications post traductionnelles (MTP) telle que l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation, la ribosylation de l'ADP, la désimination, l'isomérisation, la crotonylation ou la o-GlcNacylation (203–205). *T. gondii* est aussi pourvu d'une histone H1, cette petite protéine basique qui correspond uniquement à la partie C-terminale de l'histone H1 humain qui a été découverte récemment (TgH1-like). Cette protéine semble se lier aux autres histones et être impliquée dans la division cellulaire (206). L'ensemble de ces modifications post-traductionnelles sont très dynamiques et apparaissent sur les divers histones constituant un nucléosome de façon interdépendante pour créer ce que *Strahl et Allis* ont appelé le code histone en 2000 (207).

3.4.1.1 L'acétylation des histones :

L'acétylation a été l'une des premières modifications post traductionnelles d'histones à être découverte, et parmi les MPT (modifications post traductionnelle) des histones courantes, l'acétylation est la mieux caractérisée chez *T. gondii* (208). L'acétylation induit une décompaction de la chromatine rendant les promoteurs accessibles aux facteurs de transcription, à la machinerie de transcription et aux protéines régulatrices de l'expression des gènes. En effet, les histones étant des protéines hautement chargées positivement, leur acétylation amène des charges négatives qui vont avoir pour effet de détendre la structure de la chromatine. A l'inverse la désacétylation augmente la compaction de l'ADN et favorise l'inhibition de l'expression génique au locus concerné. Chez *T. gondii*, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont démontré que l'acétylation des histones H3 et H4 (H4ac et H3K9ac) marque les promoteurs des gènes activement transcrits. De plus, les promoteurs des gènes spécifiques des formes enkystées ou des oocystes ne présentent pas ces MPT chez les tachyzoïtes, ce qui est cohérent avec leur extinction (209). La présence de nombreuses acétylations des histones H3 et H4 du parasite a été vérifiée par spectrométrie de masse avec notamment l'identification des modifications suivantes : H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac, H3K23ac et H3K27ac, ainsi que H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac et H4K16ac. Ces MPT sont les plus abondantes trouvées au cours de cette analyse (202). L'histone H2B ainsi que les variants d'histones H2Bv, H2A.Z et H2A.X sont aussi modifiés par acétylation chez le parasite. Cette modification est donc très répandue, ce qui suggère un rôle important dans la biologie du parasite. Il est à noter que de nombreuses protéines, non-histones, sont aussi acétylées chez *T. gondii* (210).

Les enzymes impliquées dans l'acétylation des histones

Les enzymes anciennement appelées Histone-Acétyle-Transférases (HAT) ont maintenant été renommées lysine(K)-Acétyle-Transférases (KAT) car elles catalysent l'acétylation des histones mais aussi de nombreuses protéines non-histones. Chez *T. gondii*, le génome code pour cinq KAT distinctes. Ces

enzymes comprennent deux membres de la famille GCN5 (GCN5-A et -B), deux de la famille MYST (MYST-A et MYST-B) et Hat1 (211). GCN5A et B modifient H3 et probablement H4 et jouent un rôle critique dans la prolifération des parasites ainsi que dans la différenciation des bradyzoïtes (194,212–214). TgGCN5-B est considérée comme essentielle, tandis que le locus codant pour TgGCN5-A peut-être supprimé du génome du parasite sans phénotype évident au stade tachyzoïte et dans des conditions normales de culture cellulaire (212,213). Les partenaires avec lesquels TgGCN5b interagit changent entre tachyzoïtes répliatifs et tachyzoïtes démarrant une différenciation vers le bradyzoïte induit par un stress alcalin. Il apparaît ici que TgGCN5b modifie son activité et ses interactions en fonction du stade parasitaire (215). L'extinction génique de TgGCN5-A aboutit à un profil transcriptionnel perturbé lorsque les parasites sont exposés à des conditions qui sont propices à la formation de bradyzoïtes. TgGCN5-A est donc probablement impliqué dans la réponse au stress et la différenciation de tachyzoïte en bradyzoïte (213).

Les KAT de la famille MYST sont caractérisées par la présence d'un domaine MYST composé d'un motif de liaison acétyl-CoA et d'un domaine en doigt de zinc (216). Ces acétyl-transférases semblent être impliquées dans les réponses adaptatives à la privation de nutriments (217). Les deux membres de la famille MYST présents chez *T. gondii*, MYST-A et MYST-B, ont une activité d'acétylation de l'histone H4 (218,219). MYST-B semble impliqué dans la régulation du taux de réplication du parasite, la réparation de l'ADN et l'induction de γ H2A.X (H2A.X phosphorylé), qui protège contre les dommages à l'ADN.

En opposition à l'activité des KAT, les histones désacétylases (HDAC) sont responsables de la désacétylation des protéines. Les enzymes HDAC sont groupées en quatre classes phylogénétiques basées sur l'homologie de séquence, la sensibilité aux inhibiteurs et la nécessité de cofacteur pour assurer leur activité (220). La classe I des HDAC, qui est homologue à Rpd3 chez la levure, se localise dans le noyau pour réguler l'acétylation des histones et de protéines non-histones chez l'Homme. La classe II des HDAC est homologue à la protéine de levure Hda1 et possède deux sous-types, la classe IIa et la classe IIb qui sont impliquées dans la réponse à différents stress cellulaires. La classe IIa des HDAC présente une localisation entre le cytoplasme et le noyau, tandis que la classe IIb se localise principalement dans le cytoplasme chez la levure. Les HDAC de classe III sont appelées sirtuines. Ils se localisent dans le noyau, le cytoplasme, les mitochondries et partagent une séquence homologue avec la famille d'histones désacétylases de levure Sir2. Enfin la classe IV ne compte qu'une enzyme, HDAC11 chez l'Homme, qui est hautement conservée chez les organismes eucaryotes, bien que *T. gondii* semble dépourvu d'enzymes de cette classe. *T. gondii* semble posséder 7 HDAC. Cependant un criblage CRISPR/Cas9 à l'échelle du génome chez les parasites RH a montré l'essentialité des HDAC de type I chez le tachyzoïte (TgHDAC1 à 5), et la non-essentialité des HDAC de type III, SIR2 et SIR2b (221). Les TgHDAC 1, 2, 4 et 5 n'ont pas fait l'objet de caractérisation de leurs fonctions. Au contraire, la protéine TgHDAC3 a fait l'objet de nombreuses études et semble être essentielle à l'établissement du profil d'expression spécifique du tachyzoïte. En effet, l'inhibition par des composés chimiques de l'activité de TgHDAC3 a démontré son implication dans la désacétylation de H4. FR235222, ciblant spécifiquement TgHDAC3 induit une différenciation spontanée vers la forme bradyzoïte, démontrant ainsi l'implication des HDAC dans la différenciation de stade du parasite (116,214). TgHDAC3 semble s'opposer principalement à l'action de GCN5b, qui par ChIP (immuno-précipitation de la chromatine) se localise sur les promoteurs des gènes actifs chez le tachyzoïte, alors que TgHDAC3 se localise sur les promoteurs des gènes exprimés préférentiellement au stade bradyzoïte (214). Son implication dans la régulation de la différenciation et le maintien du stade tachyzoïte a été démontrée au travers de son interaction avec la protéine microorchidia (MORC) qui agit comme un répresseur transcriptionnel en amont de l'engagement sexuel. TgHDAC3 est recrutée par MORC aux promoteurs des gènes qui ne doivent pas être exprimés au stade

tachyzoïte empêchant ainsi l'accessibilité de la chromatine au niveau de ces gènes qui sont exclusivement exprimés au cours des stades sexuels (110).

3.4.1.2 La méthylation des histones

La méthylation peut se faire sur les résidus Lysine par des lysine-méthyl-transférases (KMT) ou arginine par des protéines arginine-méthyl-transférases (PRMT). Les groupes méthyle ne modifient pas la charge électrique des histones et peuvent être associés à l'activation ou à la répression des gènes. Les protéines de *T. gondii*, histones ou non-histones, sont largement méthylées (222).

Sur l'histone H4, de nombreux sites de méthylation ont été identifiés chez *T. gondii* : parmi les peptides H4 contenant H4K20 identifiés par spectrométrie de masse, la plupart étaient méthylés, le plus souvent diméthylés. H4K20me, H4K20 diméthylé (H4K20me₂) et H4K20me₃ ont également été caractérisés à l'aide d'anticorps anti-peptides par immuno-marquage et signalés comme marqueurs des régions hétéro-chromatiques (223).

Des MPT associés à des marques répressives chez les eucaryotes ont été identifiées chez *T. gondii*, notamment H3K9me, H3K36me et H3K79me, bien que les peptides avec ces MTP soient moins abondants que les peptides avec modifications associées à des marques de transcription « actives » (202).

Parmi les MPT de l'histone 3 identifiés comme étant méthylées, H3K4 est mono-, di- ou triméthylé. H3K4me₃ est une modification très conservée, présente dans les régions promotrices des gènes activement transcrits chez *T. gondii* et d'autres organismes (209). Sur cette même histone, les méthylations de K18 (me, me₂, me₃), K23 (me, me₃), R26 (me, me₂), K27 (me₃), K36 (me, me₂, me₃), K37 (me, me₂, et me₃) et R40 (me, me₂) sont présentes mais leurs fonctions n'ont pas été caractérisées chez *T. gondii*. Cependant, leurs fonctions sont connues chez d'autres organismes : R26 me semble agir dans l'activation de la transcription chez l'Homme, empêchant la liaison de l'histone désacétylase (HumanHDAC1) à la chromatine (224), tandis que K27me₃ serait impliqué dans la répression de la transcription chez les mammifères (225). K36me₂ est impliqué à la réparation de l'ADN (226) enfin K37me₁ est associé à l'origine de réplication de l'ADN (227).

Les enzymes impliquées dans la méthylation des histones

T. gondii code pour 5 PRMT dont seules deux ont été caractérisés, PRMT1 et CARM1. Les protéines recombinantes de PRMT1 et CARM1 méthylent H4R3 et H3R17, respectivement *in vitro*. Le traitement des tachyzoïtes avec AMI-1, un inhibiteur de CARM1 provoque l'enkystement chez le tachyzoïte (214). Cependant, le criblage CRISPR/Cas9 à l'échelle du génome chez les parasites RH a suggéré la non-essentialité de CARM1 chez le tachyzoïte (221). Une analyse par immuno-précipitation de la chromatine a montré une réduction de la méthylation de H3R17 dans les nucléosomes au niveau des régions promotrices des gènes spécifiques aux tachyzoïtes, suggérant l'importance de la méthylation de H3R17 dans le maintien de la forme proliférative (195). Chez la plupart des espèces, y compris *T. gondii*, PRMT1 est l'enzyme responsable de la majorité de la méthylation du résidu arginine bien qu'il existe quatre autres méthyl-transférases-candidates dans le génome de *T. gondii*. L'extinction génique de PRMT1 ne semble pas avoir modifié l'expression des gènes et l'analyse des histones a révélé une augmentation de la méthylation qui a été attribuée à des changements compensatoires dans les schémas de méthylation de l'arginine (228).

La méthylation des lysines est également importante dans la biologie de *T. gondii*. Vingt protéines présentant un domaine KMT SET (du nom de *Drosophila* Su(var)3-9, enhancer-of-zeste and trithorax) sont codées dans le génome du parasite. Bien que certaines présentent des similarités avec des méthylases des histones eucaryotes, elles sont actuellement très peu caractérisées de manière fonctionnelle. Ces protéines méthylases peuvent avoir d'autres rôles au-delà de la méthylation des histones et de la régulation de l'expression des gènes. De nombreux anticorps anti-histones méthylés commerciaux réagissent de manière croisée avec d'autres structures de *T. gondii* comme le cytosquelette indiquant que la tubuline est modifiée chez le parasite (223,229). La méthylation d'autres histones que Tg-HDAC3 semble impliquée dans le maintien du stade bradyzoïte. La localisation de la méthylase TgSET8 est enrichie dans des régions hétéro-chromatiques telles que des gènes d'ARNr réduits au silence, des répétitions satellites et des sites télomériques, avec les marques de méthylation répressives H3K9 et H4K20 (223). TgSET8 est donc susceptible de faciliter le maintien du stade chronique à l'intérieur de l'hôte.

La configuration d'hétéro-chromatine caractérisée par la présence des marques de méthylation H3K9me2 et H3K9me3 est relativement rare chez *T. gondii*. H3K9me2 et H3K9me3 ont été détectées au voisinage de l'histone centromérique CenH3 dans la région d'hétéro-chromatine centromérique de chaque chromosome (230). Les marques H3K9me3 sont également retrouvées chez les tachyzoïtes de type II dans des gènes de bradyzoïte et des stades sexuels à proximité immédiate de l'ATG (231). H4K20me1 et H4K20me3 sont des marqueurs établis de l'hétéro-chromatine chez les métazoaires et semblent remplir la même fonction chez les Apicomplexes (223).

Il est difficile de caractériser les méthylases des histones et de déterminer avec exactitude l'impact de la méthylation sur l'activité des histones et la régulation des gènes qui en résulte car les inhibiteurs de la méthylation impactent de nombreuses protéines impliquées dans de nombreuses autres voies métaboliques.

Sept membres de la famille Jumanji (JMJ, actifs sur la mono-, di- et triméthyl lysine) et deux déméthylases spécifiques à la lysine (LSD, actives sur des membres de la famille des mono- et diméthyl lysines) sont présents dans le génome de *T. gondii*. Dans l'analyse par CRISPR/Cas9, la plupart de ces membres de la famille JMJ étaient indispensables à la croissance au stade tachyzoïte ainsi que les deux membres de la famille LSD (221).

3.4.1.3 L'ubiquitination des histones

Chez d'autres espèces, l'ubiquitination des histones régule l'activation et la répression des gènes, et l'allongement de la transcription. L'ubiquitination et la SUMOylation (où SUMO est un petit modificateur lié à l'ubiquitine) sont des modifications courantes des histones chez les eucaryotes. Les deux peuvent être facilement distinguées des autres modifications par des techniques de spectrométrie de masse. Les histones de *T. gondii* sont modifiées par l'ubiquitine sur des sites connus chez d'autres eucaryotes. De plus, le parasite semble aussi ubiquitiner ses histones sur des sites qui ne le sont pas chez l'homme ou la levure (232).

Les petits modificateurs ubiquitine et SUMO ont respectivement une taille de 9 kDa et 11 kDa. Les deux MPT ont été identifiées sur des histones de *Plasmodium* (233,234) et TgH3 de *Toxoplasma* (202). De

plus, la SUMOylation a été identifiée sur des histones du parasite grâce à des anticorps dirigés contre cette modification (235) et par des méthodes de spectrométrie de masse (202).

Une lysine ubiquitinylée unique sur H3 (K115) a été détectée par spectrométrie de masse, suggérant que les histones de *T. gondii* ubiquitinylées sont peu abondantes (202).

3.4.1.4 Autres modifications post-traductionnelles et association de diverses modifications au sein du nucléosome

A ces principales modifications post-traductionnelles des histones s'ajoutent de nombreuses autres modifications chimiques des « queues » d'histones (et l'extrémité C-terminale de H2A) (Figure 16) telles que la phosphorylation, la sumoylation, la ribosylation de l'ADP, la déimination (ou citrullination), et l'isomérisation. Les nouvelles modifications post-traductionnelles des histones découvertes dans un second temps incluent la succinylation, la crotonylation et la O-GlcNAcylation (202,204,205). Ces modifications ont été identifiées chez *T. gondii* par spectrométrie de masse (202).

3.4.1.4.1 La succinylation

La succinylation sur les peptides de l'histone H3 a été identifiée grâce à des études de mutagenèse et de spectrométrie de masse ; certaines ayant déjà été identifiées dans une variété d'espèces eucaryotes impliquées dans l'interaction nucléosome-ADN, la fonction télomérique et le silençage de l'ADN ribosomique (ADNr) (205). Par Spectrométrie de masse, H3K122succ, H4K16succ et H4K31succ ont été identifiés chez *T. gondii*. Ces résultats ont été confirmés par une localisation nucléaire en microscopie par immuno-marquage (202).

3.4.1.4.2 La formylation

La N-lysine N-formylation est une MPT impliquée dans les dommages oxydatifs de l'ADN chez les eucaryotes (236). Plusieurs peptides formylés de H3 et H4 ont été identifiés par spectrométrie de masse chez *T. gondii* sans caractérisation de fonctions biologiques (H3K56, H3K122, H4K31, H4K59, H4K67, H4K91) (202).

3.4.1.4.3 La propionylation

La propionylation de la lysine a été décrite en 2007 comme une MPT pouvant être catalysée par les acétyl-transférases (237). Chez *T. gondii*, deux propionylations sur H3 (K115) et H2B (K73) ont été détectées (202).

3.4.1.4.4 La crotonylation

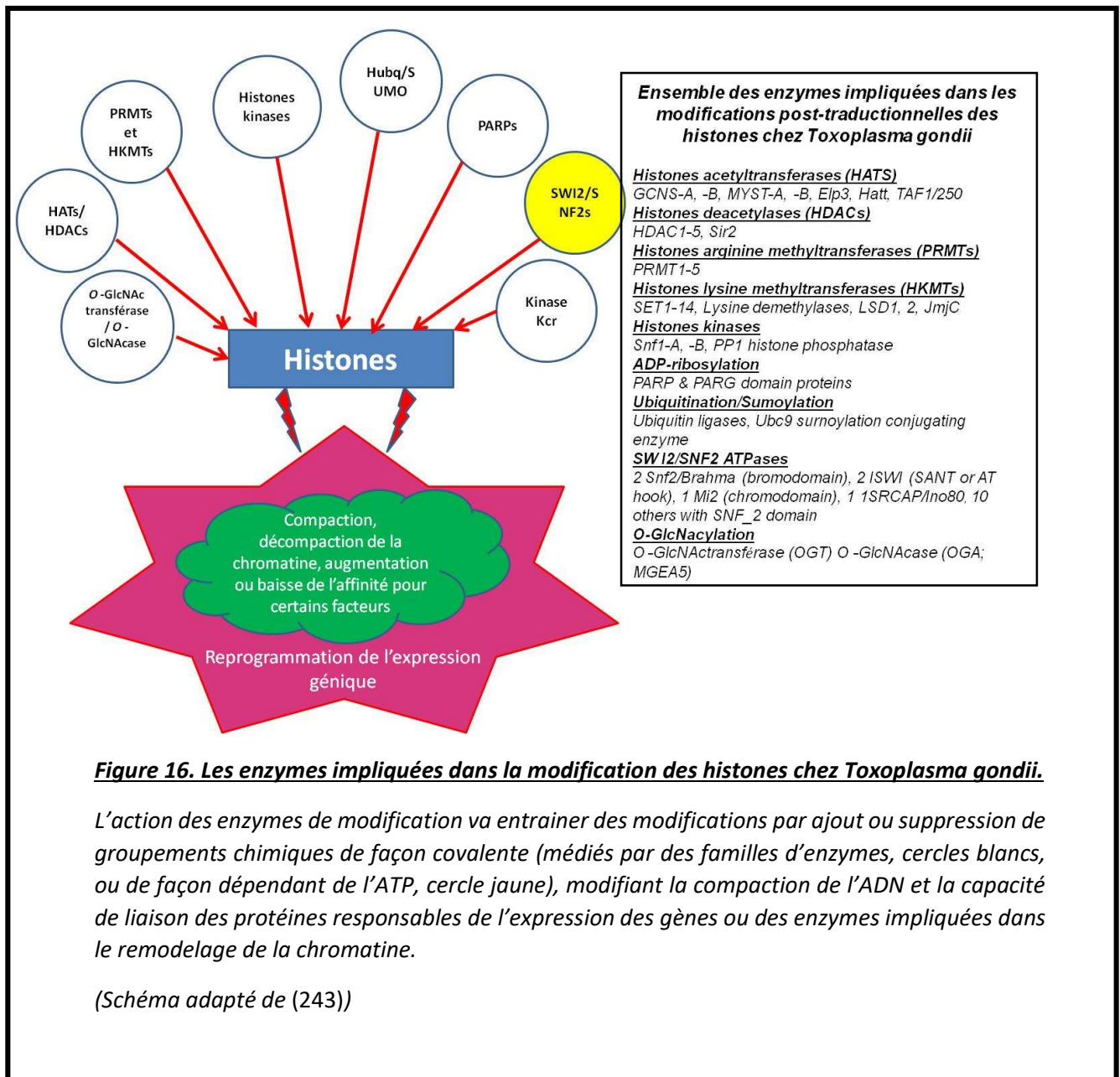
La crotonylation de la lysine a été décrite en 2011 comme une MPT d'histone associée à des promoteurs ou activateurs actifs (204) et retrouvée dans la même étude que précédemment par spectrométrie de masse (202).

La fonction de la plupart des MPT n'est pas encore établie chez les eucaryotes et à la richesse des MPT s'ajoutent la synergie et l'inter-combinaison des différentes modifications entre elles dont résulte la finesse de cette régulation. La richesse des modifications post traductionnelles d'histones chez *T. gondii* implique un rôle important de ces modifications dans la régulation de l'expression des gènes.

3.4.1.5 Les variants d'histones

Outre les modifications post-traductionnelles que peuvent subir les histones, ces dernières peuvent aussi être remplacées par des variants d'histones (238,239). Chez la levure, les histones canoniques sont synthétisées durant la réplication lors de la phase S, alors que les variants sont généralement exprimés de manière constitutive tout au long du cycle cellulaire (240). Les variants d'histones modifient la structure de la chromatine et confèrent de nouvelles propriétés régulatrices apportant un niveau de complexité supplémentaire au « code histone ». *T. gondii* exprime 5 variants d'histones : CenH3 et H3.3 variants de H3, H2A.X, H2A.Z variant de H2A et H2B.Z variant de H2B.

H3.3 et H2A.X ont été détectés sur les télomères et les séquences associées aux télomères, tandis que H3.3, H2A.X et CenH3 étaient enrichis aux centromères (241). Alors que H2A.X est assez similaire à l'histone canonique (88% d'identité), H2A.Z ne montre que 56% d'identité avec H2A (202). Les histones H2A.Z et H2B.Z colocalisent avec la MPT H3K4me3 dans les régions promotrices des gènes exprimés ou prêts à être exprimés tels les gènes spécifiques du stade bradyzoïte chez le tachyzoïte durant la phase S/M du cycle cellulaire (241). Les régions enrichies en H2A.X sont spécifiques de séquences faiblement exprimées et, de ce fait, ne colocalisent pas avec les régions riches en H2A.Z et H2B.Z (241). La répartition de H2A.Z semble être dépendante du statut transcriptionnel d'un gène avec un enrichissement dans la région codante des gènes silencieux spécifiques au bradyzoïte et dans les régions promotrices des gènes exprimés. Ce variant est absent des régions codantes des gènes exprimés (202,241). Le niveau global d'expression de H2A.X augmente lors de la conversion de stade induite *in vitro* indiquant que H2AX pourrait faciliter la répression génique globale au cours du stade bradyzoïte latent (242).



Les analyses bio-informatiques ont démontré qu'il existe une diversité étonnamment élevée au sein des protéines qui constituent la machinerie de modification de la chromatine. La découverte de molécules impliquées dans l'inhibition d'enzymes modifiant les histones (115,211,214,244) a permis de mettre en lumière l'importance du code histone dans la régulation de gènes, la réponse au stress oxydatif, les mécanismes de réparation de l'ADN mais également lors de la transition et le maintien vers diverses formes parasitaires. La synergie entre deux facteurs que sont les modifications post-traductionnelles et le remplacement dynamique d'histones au sein du nucléosome par d'autres histones canoniques ou variants constituent le « code histone ». Ce code semble jouer un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes chez *T. gondii*.

4 *L'interconversion ou la clef d'une pathogénicité complexe :*

Au cours du cycle de vie de *T. gondii*, les parasites produisent des formes capables d'échapper à l'immunité de l'hôte et d'assurer une transmission efficace à l'hôte suivant. La conversion de la membrane de la vacuole parasitophore contenant les tachyzoïtes en paroi kystique permet au parasite de persister pendant des périodes prolongées dans l'hôte afin de maximiser la probabilité de transmission vers un hôte définitif (un félin) ou intermédiaire (presque tous les vertébrés à sang chaud). L'interconversion entre la forme proliférative et enkystée autorise un mode de dissémination asexué en contournant le cycle sexuel (245).

4.1 *Structure du bradyzoïte :*

Durant la conversion du tachyzoïte vers le bradyzoïte s'opèrent des modifications ultra-structurales tant au niveau du parasite qu'au niveau de la vacuole parasitophore. De forme plus allongée que les tachyzoïtes, les bradyzoïtes présentent un noyau situé à leur extrémité postérieure et possèdent des organites « rhoptries » denses aux électrons et de nombreux micronèmes (246,247). Des granules d'amylopectine sont aussi présents dans le cytoplasme du parasite (246). À la différence des tachyzoïtes, les bradyzoïtes se divisent de façon asynchrone au sein du kyste (248,249). Bien que continuant à se diviser de façon asynchrone, les bradyzoïtes représentent un stade de croissance ralenti du parasite avec un ADN nucléaire majoritaire de contenu 1N (194). La taille et la forme des kystes matures sont variables. En moyenne, un kyste cérébral mature est sphérique, d'environ 10 à 70 µm de diamètre et le nombre de parasites dans le kyste peut atteindre des milliers (Figure 17).

4.1.1 *Apparition de la paroi kystique :*

Le kyste est entouré d'une paroi qui est un renforcement de la membrane parasitophore apparaissant sous celle-ci et composée de chitine, de polysaccharides et de glycoprotéines qui peuvent être détectés à l'aide de diverses lectines marquées par fluorescence (250,251). L'agglutinine de *Dolichosbiflorus* (DBA) qui reconnaît la N-acétyl galactosamine a une forte affinité pour une glycoprotéine de la paroi du kyste (CST1) avec un domaine mucine qui est localisé dans la paroi du kyste sous la membrane vacuolaire. CST1, précédemment annotée comme SRS44, est régulièrement utilisée pour détecter les kystes en culture tissulaire (251,252). La délétion du gène entraîne une altération de la formation des kystes et des kystes très fragiles, caractérisés par un amincissement et une perturbation de la région sous-jacente de la paroi du kyste (253). La formation de la paroi du kyste est un événement précoce du développement du bradyzoïte et donc un premier marqueur de la conversion des tachyzoïtes vers des bradyzoïtes.

Tous les constituants de la paroi kystique n'ont pas encore été identifiés et les fonctions moléculaires des composés identifiés ne sont pas encore totalement élucidés (254,255). Des protéines de granules denses (protéines GRA) ont également été trouvées dans la paroi du kyste (252). Au stade bradyzoïte, GRA1, GRA2, GRA3, GRA5, GRA6 et GRA7 ont été identifiés (256,257). MAG1 (Matrix antigen 1) est un

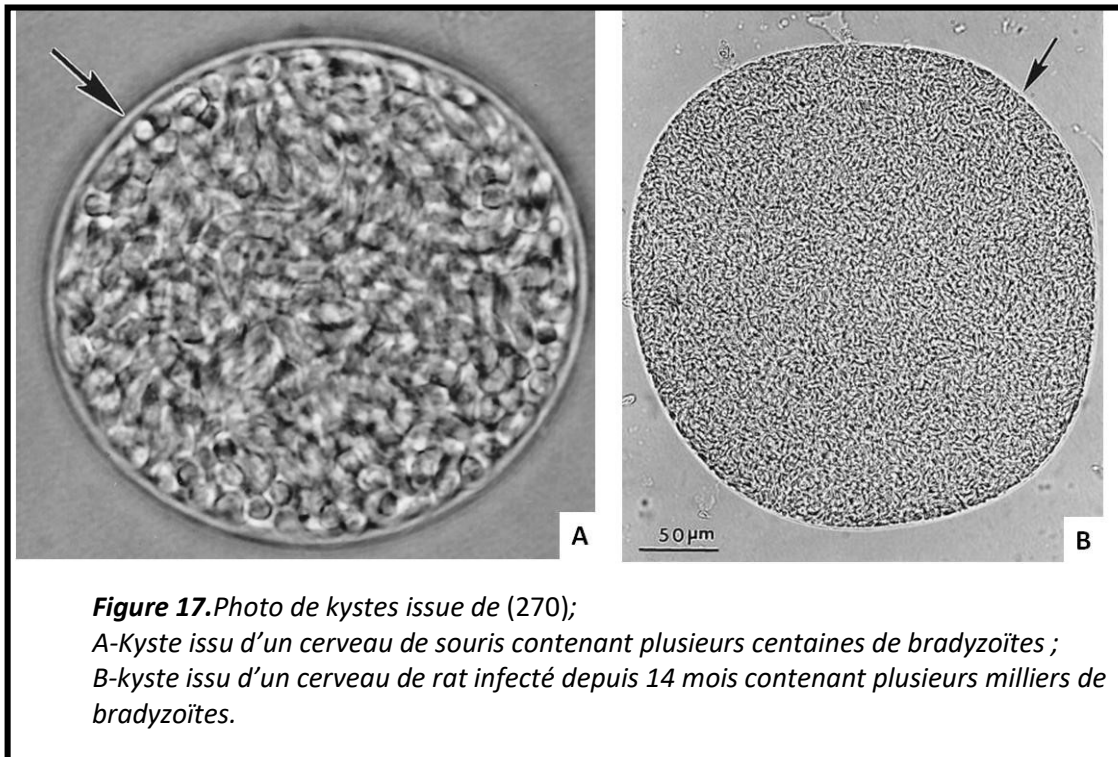
autre antigène, issu des granules denses, de la paroi et de la matrice du kyste (258). Il était considéré autrefois comme spécifique de la forme enkystée. Cependant, MAG1, est également présent à l'intérieur de la vacuole parasitophore au stade tachyzoïte. Son abondance est significativement plus faible, ce qui suggère qu'il joue un rôle important dans la formation de la paroi du kyste bradyzoïte (252,259). Une pseudokinase de bradyzoïte (BPK1), une protéine contenant un domaine de répétition adhésif de micronème (MCP4) et un protéo-phospho-glycane ont été identifiées au niveau de la paroi du kyste (260,261), mais les fonctions de ces protéines ne sont pas encore connues.

4.1.2 Le métabolisme du bradyzoïte

La transformation de tachyzoïtes répliquatifs en bradyzoïtes latents s'accompagnent de changements métaboliques permettant au parasite de diminuer son métabolisme général pendant de longues périodes. Ces changements sont la conséquence de la régulation à la hausse de diverses enzymes métaboliques spécifiques au bradyzoïte, en particulier celles impliquées dans le traitement du métabolisme des radicaux oxygénés et du métabolisme des glucides. L'apparition de granules d'amylopectine lors de la différenciation en bradyzoïte indique que le métabolisme des glucides est modulé lors du changement de stade. Cette régulation du niveau d'amylopectine est essentielle au maintien d'une infection chronique chez la souris. Certaines perturbations dans les processus de synthèse de l'amylopectine par mutagenèse dirigée contre des enzymes tels que la glycogène-phosphorylase de *Toxoplasma* (TgGP) aboutissent à une baisse significative de la charge kystique dans les cerveaux de souris (262). Bien que le rôle exact de ces granules ne soit pas encore totalement identifié, l'hypothèse actuellement formulée est qu'ils peuvent servir de réserve d'énergie à long terme lors d'une infection chronique, ce qui pourrait aider à maintenir la viabilité des parasites dans des niches à faible teneur en nutriments, ou servir de source d'énergie rapidement disponible pour la réactivation lorsqu'ils retrouvent des conditions favorables (262). La voie de synthèse de l'amylopectine semble très régulée et toute perturbation de sa synthèse à la hausse ou à la baisse aboutit à des phénotypes délétères au stade enkysté (263,264).

La production d'énergie semble également fortement différenciée entre le tachyzoïte et le bradyzoïte. En effet, la production d'ATP chez le bradyzoïte repose sur la glycolyse anaérobie du fait de l'absence de cycle de Krebs fonctionnel (265,266) et de changements majeurs d'isoformes spécifiques au bradyzoïte de la lactate-déshydrogénase (LDH2), de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6-PI) et de l'énolase-1 (ENO1). Ces enzymes présentent une stabilité et des propriétés enzymatiques différentes par rapport à leurs homologues tachyzoïtes (265,267,268). La délétion génique de LDH2 provoque une diminution drastique du nombre de kystes se formant dans le cerveau des souris démontrant l'importance de cette enzyme dans l'établissement de l'infection chronique.

Le maintien de l'infection chronique sur le long cours repose également sur l'autophagie et la capacité du parasite à renouveler d'anciens organites ou composants cellulaires. L'entrave génétique ou chimique de l'enzyme « cathepsine-protéase L », impliquée dans ces mécanismes, a provoqué une accumulation d'auto-phagosomes non digérés suivi de la mort des bradyzoïtes ainsi perturbés. Bien que non essentielle à la réplication du tachyzoïte et aux stades précoces de différenciation du bradyzoïte, elle est essentielle à la viabilité du kyste tissulaire mature indiquant l'obligation de recycler les protéines et les organites pour permettre au bradyzoïte de persister (269).



4.2 Modèle d'étude du bradyzoïte :

Jusque récemment, le stade bradyzoïte mature n'a été obtenu que par purification des kystes provenant de cerveaux de rongeurs. Par ces techniques, l'obtention de grandes quantités de kystes tissulaires peut être difficile sans avoir à multiplier le nombre d'animaux. Par ailleurs, le développement de systèmes alternatifs aux modèles animaux tels que les modèles de culture cellulaire *in vitro* représente un objectif majeur visant à la fois à réduire les coûts et à dépasser les limites éthiques. Des systèmes de différenciation *in vitro* ont été développés, accélérant la découverte des mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation.

4.2.1 La génération de bradyzoïtes in vitro :

Les premiers stades de différenciation vers le bradyzoïte peuvent être explorés par l'utilisation de techniques *in vitro*. Divers types de stress exercés sur le tachyzoïte poussent le parasite à enclencher un début de différenciation vers la forme kystique (Tableau 4).

La méthode la plus communément utilisée est le traitement alcalin continu des cellules hôtes infectées par le parasite en substituant le milieu de croissance classique (DMEM, 10% Sérum de veau fœtal) par le milieu de croissance RPMI ou DMEM contenant moins de sérum de veau fœtal (1%) et ajusté à un pH de 8,0 à 8,2 par ajout de NaOH (13,271). De même, un passage des parasites extracellulaires en condition de pH alcalin induit une conversion de ces derniers après infection des cellules hôtes (272).

Une initiation de la conversion peut être aussi obtenue par divers protocoles d'épuisement de facteurs environnementaux tels que la privation d'arginine (273), l'incubation axénique (274) et l'épuisement de la pyrimidine pour des parasites déficients pour l'uracile phospho-ribosyl-transférase (UPRT) cultivés dans 0,03 % de CO₂.

Stress permettant l'initiation de la différenciation

pH alcalin (pH 8)

Choc thermique (43 °C)

Privation de nutriments

Carence en arginine

Carence en pyrimidine

Privation de cholestérol

Modulateurs de l'immunité et de l'inflammation

IFN- γ

NO

IL-6

LPS

Inhibiteurs métaboliques

Oligomycine, antimycine A

Myxothiazol, roténone, atovaquone

Médicaments et petits composés

Composé 1

Pyriméthamine

Sulfadiazine

Modulateurs de signalisation des nucléotides cycliques

Apicidine, FR235222 (inhibiteurs d'HDAC)

Tableau 4. Facteurs d'induction de la différenciation des bradyzoïtes *in vitro* (IFN, interféron ; NO, monoxyde d'azote ; IL, interleukine ; LPS, lipo-poly-saccharide ; HDAC, histone désacétylase)

Issu de (275)

Le stress induisant la conversion peut être également provoqué par divers traitements chimiques ; tels qu'un traitement à la tunicamycine des cellules infectées qui provoque un stress du réticulum endoplasmique et le développement de bradyzoïtes (104), ou l'utilisation d'inhibiteurs mitochondriaux (276,277). Un stress chimique à l'aide d'arsénite de sodium peut également être appliqué (13). L'inhibition de la sortie du parasite (*egress*) induite par le calcium par traitement à l'herbicide fluridone entraîne une plus grande proportion de kystes en culture (278).

L'ensemble de ces techniques *in vitro* présentent un défaut majeur car aucune ne permet de générer des kystes matures. Seules les premières étapes de différenciation semblent induites par ces techniques.

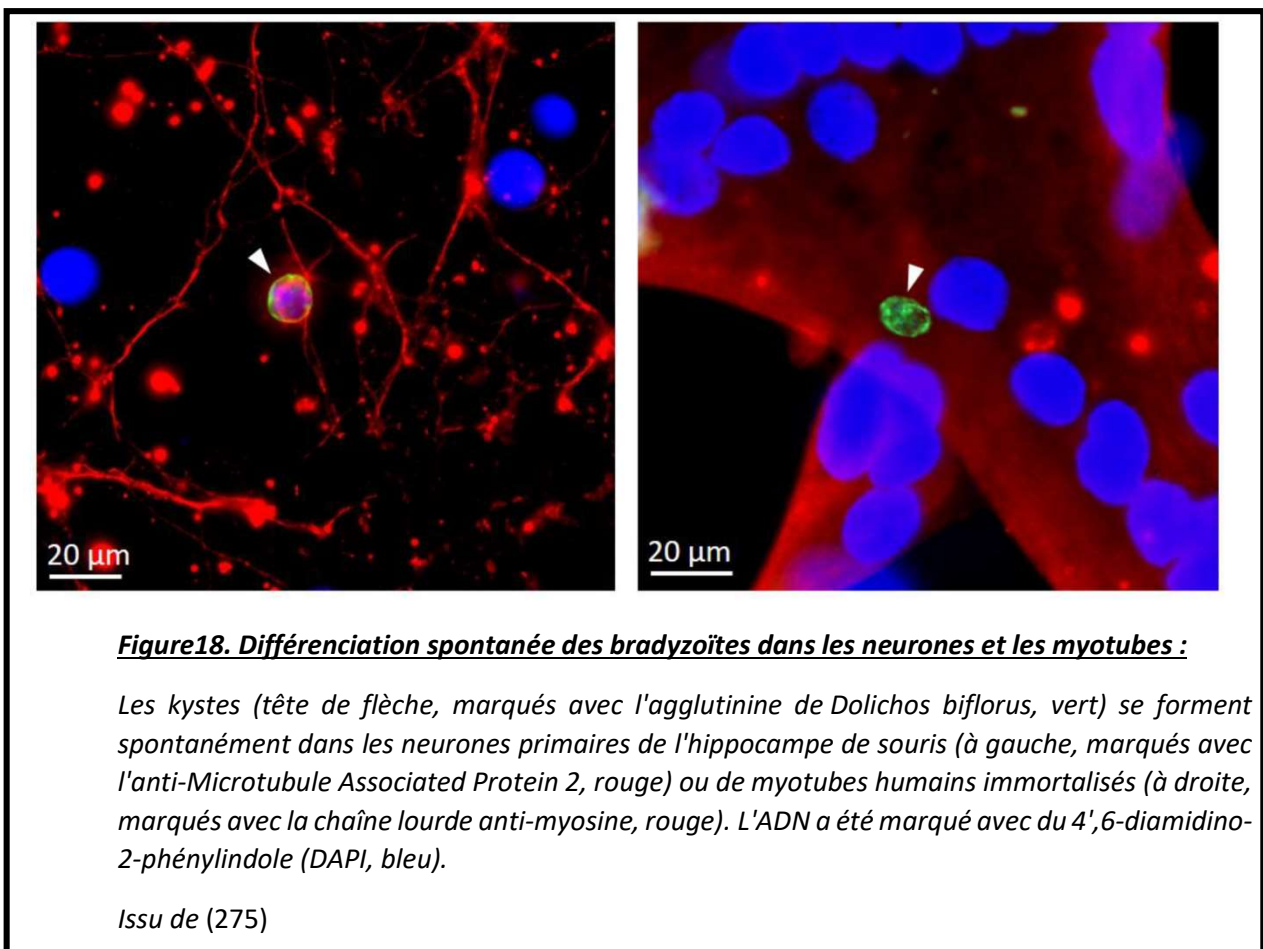
Les kystes ayant un tropisme pour les tissus nerveux et musculaires, l'utilisation de cellules musculaires et neuronales comme cellules hôtes pour la culture du parasite présente un intérêt quant à l'étude des kystes (Figure 18). L'utilisation de lignées cellulaires musculaires squelettiques primaires qui peuvent être différenciées en myotubes matures *in vitro* a été assez bien documentée (279–281).

La maturation des cellules musculaires myoblastes mononucléaires proliférant en myotubes polynucléés matures différenciés aboutit à l'arrêt de la division des tachyzoïtes infectant ces cellules et à leur différenciation en bradyzoïte. Suite à l'infection par *T. gondii*, les myotubes, mais pas les myoblastes ou les fibroblastes, régulent à la hausse le régulateur négatif du cycle cellulaire Tspyl2. Il est important de noter que l'inactivation de Tspyl2 médiée par des ARN interférents abroge la différenciation des SkMC (skeletal muscle cells) en myotubes, permet à *T. gondii* de se répliquer à nouveau et conduit ainsi à l'abolition de la formation de kystes tissulaires. Ces données indiquent donc que le retrait du cycle cellulaire hôte médié par Tspyl2 est un déclencheur physiologique de la conversion du stade répliatif vers le stade enkysté dans les cellules musculo-squelettiques matures (280).

Dans une autre étude, la résistance à certains antibiotiques dirigés contre la forme répliatif du toxoplasme a été testée sur des bradyzoïtes cultivés en myotubes polynucléés matures (281). Des kystes tissulaires âgés de 14, 21 et 28 jours ont été traités avec 5 µM et 20 µM de pyriméthamine, 20 µM de sulfadiazine et 0,1 µM de 1-hydroxy-2-dodécyl-4(1)-quinolon (HDQ), un inhibiteur de la dihydro-orotate déshydrogénase (DHOD) et de la NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) déshydrogénase alternative. Les cultures de bradyzoïtes ont survécu à tous les traitements testés. Alors que la résistance à la sulfadiazine, à la HDQ ou à de faibles doses de pyriméthamine était déjà complètement développée après 21 jours, indiquée par un RS (Score de Résistance) de 1, la résistance à de fortes doses de pyriméthamine a augmenté jusqu'à 28 jours de maturation. Les myotubes infectés par le tachyzoïte, qui ont servi de contrôle et sont présentés comme des « cultures différenciées de 0 jour », n'ont survécu que marginalement au traitement avec 5 µM de pyriméthamine, avec un faible RS de 0,18. La résistance contre deux inhibiteurs différents de la kinase bosselée (BKI), BKI1553 et BKI1294, dont il a été démontré qu'elles diminuent la charge de kystes chez les souris infectées de manière chronique, a également été testée. Les tachyzoïtes ne se sont pas développés après une exposition à quatre fois la CI_{50} de chaque composé. En revanche, les kystes tissulaires déjà âgés de 14 jours étaient résistants aux deux traitements, avec un RS de 0,42 et 0,83, respectivement. La résistance a encore augmenté et BKI1553 est devenu complètement inefficace contre les kystes âgés de 28 jours tandis que les kystes ont atteint un RS de 0,89 contre BKI1294. L'ensemble de ces résultats tend à démontrer la maturité avancée des bradyzoïtes obtenue en myotubes. Ces protocoles de cultures présentent de grands intérêts pour l'élucidation des voies métaboliques spécifiques aux bradyzoïtes, l'étude des étapes clés dans la

différenciation et l'identification de futures molécules actives contre les kystes tissulaires pour lesquels aucun traitement n'est, pour le moment, connu.

Des études similaires ont été réalisées avec des modèles neuronaux. L'utilisation de lignées cellulaires issues de tumeurs neuronales ou de cultures de neurones primaires (282), de neurones dérivés de cellules souches pluripotentes induites, ou via des méthodes de reprogrammation cellulaire (283,284) permettent après infection une génération spontanée de kystes. Passeri *et al.* ont mis au point un protocole d'infection de neurones primaires par *T. gondii* afin d'étudier les changements engendrés par une infection sur le neurone. Malheureusement, leur protocole ne permet pas de suivre la différenciation vers la forme bradyzoïte au-delà de 5 jours post-infection. Des changements structurels progressifs ont également été décrits dans le réseau des neurites qui pourrait expliquer les altérations fonctionnelles décrites au niveau des neurones lors d'une infection chronique à *T. gondii* (285).



Ces cultures de neurones ou de cellules musculaires représentent un environnement de moindre complexité par rapport à un organisme total. Cependant, ces nouvelles approches expérimentales offrent des perspectives intéressantes pour comprendre les bases moléculaires de la différenciation des bradyzoïtes, l'étude de la maturation du kyste et de la persistance du parasite chez l'hôte.

4.3 Déterminants de l'environnement cellulaire propice au développement spontané des bradyzoïtes

De nombreux facteurs de la cellule hôte sont susceptibles d'influer sur le changement de forme parasitaire. Le tachyzoïte pour se diviser rapidement, va réquisitionner une partie des ressources de la cellule hôte à son avantage. La carence en certaines de ces ressources va diminuer la vitesse de division du parasite et favoriser une différenciation vers la forme enkystée (286). Comme décrit, précédemment, un épuisement en arginine ou en lipoprotéines dérivées du cholestérol a démontré en culture cellulaire une différenciation spontanée des parasites (273,287). Un taux de glycolyse élevé de la cellule hôte va engendrer des concentrations en lactate élevées ce qui va maintenir le parasite en division et inhiber une conversion en bradyzoïte (288).

Les facteurs environnementaux vont exercer une grande influence sur la conversion ou le maintien dans une forme parasitaire, ce qui peut expliquer que, bien que *T. gondii* puisse infecter n'importe quelle cellule nucléée des animaux à sang chaud, certains types cellulaires vont être propices à la conversion et au maintien du parasite dans sa forme bradyzoïte. De précédents travaux suggèrent que certains facteurs internes propres à ces cellules agissent comme un signal indiquant au parasite de s'enkyster (289). Le niveau de différenciation des cellules hôtes est décrit comme déterminant dans ce processus (280).

La comparaison des réponses transcriptionnelles de différents types de cellules hôtes de souris (myotubes, neurones, astrocytes et fibroblastes) infectées ou non par une souche avirulente de *T. gondii* a montré que les transcriptomes des cellules hôtes étaient largement spécifiques au type de cellule et que l'infection par *T. gondii* n'avait qu'un impact mineur sur les profils d'expression de la cellule hôte. L'étude a également identifié trois groupes de gènes qui ont montré des profils d'expression similaires dans les SkMC et les neurones par rapport aux astrocytes et aux fibroblastes. Ces groupes sont enrichis en gènes associés au cycle cellulaire, à la production d'énergie et à l'inflammation.

Les facteurs environnementaux liés à l'état de différenciation/maturation des cellules musculaires ou des neurones, ainsi que les facteurs métaboliques propres à ces cellules différenciées sont donc des pistes de recherches sérieuses pour identifier les facteurs déclencheurs de la différenciation.

4.4 L'expression différentielle entre le tachyzoïte et le bradyzoïte :

Le criblage de bibliothèques d'expression dans des bactéries avec un pool d'anticorps polyclonaux contre les antigènes bradyzoïtes ou des bibliothèques d'étiquettes de séquence exprimées (EST) ont conduit à l'identification de quelques gènes liés aux bradyzoïtes dans un premier temps tels que *bag1* (290) et *ldh2* (291). L'amélioration des techniques de séquençage a permis l'identification de nombreux autres gènes impliqués dans le changement de forme parasitaire (110,274,292).

Des antigènes spécifiques tels que l'antigène de surface 4 (SAG4); antigène de surface bradyzoïte, BSR4; antigène de surface 2/2D (SAG2/2D) ; antigène de paroi de kyste de 116 kDa (CST1); les antigènes bradyzoïtes 1–5 (BAG 1/5) ; des isoformes d'enzymes métaboliques spécifiques (lactate déshydrogénase 2, LDH2 ; émolase 2, ENO1) sont aujourd'hui considérés comme des marqueurs de la forme kystique (293,294).

Le séquençage à haut débit (RNA-seq) a permis une approche plus globale et non biaisée pour déterminer les profils d'expression différentielle entre tachyzoïtes et bradyzoïtes. L'analyse de l'ARN total des cerveaux de souris infectées de manière aiguë et chronique a identifié plusieurs centaines de gènes de parasites régulés de manière significative entre les deux stades de la maladie. Cela a permis de mettre en évidence une expression différentielle de marqueurs de surface après 4 semaines d'infection (295), alors que les profils de transcription restaient essentiellement stables trois mois après l'infection (296). De nombreux gènes exprimés uniquement sous la forme bradyzoïtes sont des « gènes hypothétiques » qui ne sont pas caractérisés (295).

4.4.1 La régulation et les facteurs transcriptionnels dans le bradyzoïte

Une fois le processus de changement de stade enclenché, des cascades d'expression génique sont observées (295,297), ce qui indique que la régulation transcriptionnelle joue un rôle important à ce stade. Ces études rapportent également des groupes fonctionnels distincts de gènes qui sont régulés de manière différentielle dans les niveaux d'expression entre tachyzoïte et bradyzoïte.

Les facteurs de transcription de type ApiAP2 sont fortement impliqués dans ces cascades de régulation de l'expression des gènes lors de la différenciation (298,299). Une dynamique dans la maturation des kystes a été démontrée avec certains facteurs AP2 régulés à la hausse en début de différenciation du bradyzoïte, puis présentant une expression réduite une fois le kyste tissulaire mature formé (182,300). Durant la différenciation, un équilibre entre activateurs et répresseurs des gènes bradyzoïtes se met en place. AP2IV-3 et AP2XI-4 sont des activateurs de gènes bradyzoïtes (300,301). Leur délétion génique (« knock-out ») aboutit à des phénotypes délétères pour la formation de kystes *in vivo et in vitro*. Inversement, un autre facteur AP2 qui est régulé positivement au début du développement du bradyzoïte, AP2IX-9, agit comme un répresseur de la formation du bradyzoïte. Sa délétion génique provoque un phénotype opposé aux phénotypes décrits précédemment pour AP2IV-3 et AP2XI-4 (300,302). AP2IV-3 et AP2IX-9 régulent des cibles communes bien qu'ayant des actions régulatrices opposées. Il apparaît ici que le parasite se trouve dans un état versatile conservant la possibilité de revenir rapidement vers une répllication rapide et un arrêt de l'initiation bradyzoïte.

Certains facteurs de transcription AP2 régulés par le cycle cellulaire dans les tachyzoïtes en division sont impliqués dans la différenciation de tachyzoïte vers bradyzoïte. En effet, AP2IX-4 et AP2IV-4 bien que non essentiels pour la division de la forme proliférative se sont avérés être des répresseurs de l'expression des gènes du bradyzoïte (298,303). Leur délétion aboutit à un défaut de formation de kystes *in vitro* pour AP2IX-4, *in vivo* pour AP2IV-4. AP2IV-4 culmine au stade S/M dans les tachyzoïtes et réprime l'expression de nombreux facteurs spécifiques de la paroi kystique. Son absence entraîne une expression de ces nombreux facteurs au stade bradyzoïte et l'absence totale de kystes dans le cerveau des souris infectées.

Des études ont également démontré l'existence d'autres facteurs différents des ApiAP2 agissant comme répresseurs de l'expression de gènes bradyzoïtes pendant la prolifération des tachyzoïtes. Des pull-downs utilisant le promoteur spécifique du bradyzoïte *ENO1* (énolase 1) comme appât ont permis de mettre en évidence un homologue de la protéine de liaison FK506 (FK506BP) appelé *Toxoplasma* facteur nucléaire 3 (TgNF3) associé à la fois aux nucléosomes et aux histones libres permettant de réprimer certains gènes spécifiques du bradyzoïte tel que l'enzyme glycolytique bradyzoïte *ENO1* (304).

Un criblage génétique médié par Cas9 a permis de mettre en évidence un facteur de transcription appelé BFD1, qui semble agir comme l'interrupteur principal pour la différenciation en bradyzoïtes, car il est à la fois nécessaire et suffisant pour ce processus (196). BFD1 est une protéine facteur de transcription de la famille des Myb qui peut piloter l'expression des gènes nécessaires à la formation des bradyzoïtes. Il met également en évidence une grande diversité et une complexité dans le contrôle du processus de différenciation (196).

Une régulation de type transcriptionnelle avec des FT de type AP2 et Myb est au cœur de la régulation à la hausse des gènes spécifiques aux bradyzoïtes et de la transition vers les kystes latents accompagnés d'une régulation à la baisse simultanée des gènes spécifiques au tachyzoïte.

4.4.2 L'importance du contrôle traductionnel dans l'initiation de changement de stade parasitaire

Nous avons vu précédemment que certains types de stress cellulaires peuvent induire une différenciation vers la forme enkystée. Certaines recherches se sont naturellement orientées vers l'étude des voies de réponse au stress chez le parasite afin de mettre en lumière les mécanismes amorçant la différenciation. La phosphorylation de la sous-unité alpha du facteur d'initiation eucaryote 2 (eIF2 α) est connue chez l'ensemble des eucaryotes pour contrôler la traduction globale, ce mécanisme est la réponse intégrée au stress (ISR). L'ISR présente une famille de protéines kinases apparentées qui phosphorylent la sous-unité α de eIF2 α , chacune spécifique d'un type de stress. eIF2 permet la liaison de l'ARNt-Met au ribosome d'une manière dépendante du GTP et la traduction commence après le recrutement de la sous-unité ribosomique 60S et la formation du complexe d'initiation. Une fois la phase d'initiation terminée, eIF2 est libéré du ribosome lié au GDP sous la forme d'un complexe binaire inactif. La phosphorylation a lieu au niveau de la sérine 51 de la sous-unité α . Une fois phosphorylé, eIF2 montre une affinité accrue pour eIF2B, son facteur d'échange de guanine. Cependant, eIF2B ne peut échanger du GDP contre du GTP que si eIF2 est dans son état non phosphorylé. En conséquence, la traduction s'arrête puisque l'initiation n'est plus possible. De façon générale, cette phosphorylation va induire une chute du niveau de traduction globale au sein de la cellule permettant de conserver les ressources et d'initier une reconfiguration de l'expression des gènes pour gérer efficacement les conditions de stress (305)(306). L'homologue d'eIF2 α chez *Toxoplasma* (TgIF2 α) est un facteur impliqué dans la régulation de la transition du tachyzoïte au bradyzoïte, dans le maintien du bradyzoïte latent, ainsi que dans la réactivation des bradyzoïtes en tachyzoïtes proliférants (307). Une étude a montré que lors des conditions de stress communément utilisées pour induire la différenciation parasitaire, TgIF2 α est alors phosphorylé (308) et est à un niveau de phosphorylation élevé dans les bradyzoïtes matures (104) (245). L'inhibition de la déphosphorylation de TgIF2 α induit par un traitement au salubrinal ou au guanabenz provoque une initiation de la différenciation vers le stade bradyzoïte sans possibilité de retour vers la forme à réplique rapide (103). La traduction lors de la phosphorylation d'eIF2 α chez les eucaryotes va se concentrer sur un ensemble d'ARNm codant pour des protéines qui permettront de résister au stress. Si nous nous intéressons à ce qui se passe dans ces conditions chez *T. gondii*, un certain nombre de ces ARNm préférentiellement traduits codent pour des protéines contenant des domaines AP2 (309).

Le 5' UTR du gène du facteur de transcription BFD1 code quatre cadres de lecture ouverts non traduits, longs de 225 à 273 nucléotides qui caractérisent de nombreux gènes régulés post-transcriptionnellement (310). Aux phases aiguës et chroniques de l'infection, ce gène est transcrit en

ARN messenger. Cependant, des auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle la protéine BFD1 est préférentiellement fabriquée lors de l'infection chronique par régulation post-transcriptionnelle (196). Cette hypothèse est vérifiée dans la publication (311) en 2022 dans laquelle les auteurs mettent en évidence une protéine qu'ils appellent BFD2 qui est un régulateur de la traduction possédant un domaine en doigt de zinc de type CCCH se liant sur l'ARN messenger de BFD1 afin d'en réguler sa traduction. BFD1 régule la transcription de BFD2 qui régule la traduction de BFD1, les auteurs décrivent donc une boucle d'activation contrôlant l'engagement du parasite dans la conversion de la forme tachyzoïte vers la forme bradyzoïte. BFD2 apparaît également comme un régulateur de la traduction pour de nombreux autres ARN dont l'implication dans la conversion bradyzoïte n'a pas été démontrée.

4.4.3 L'importance du cycle cellulaire dans l'initiation de la différenciation

Le cycle cellulaire du parasite semble être déterminant dans le processus de différenciation vers le stade bradyzoïte. En effet, lorsque le cycle cellulaire est bloqué, la différenciation ne peut pas se produire (312). Des études ont tenté d'élucider le point du cycle cellulaire au cours duquel le tachyzoïte enclenche la différenciation et quels facteurs jouent un rôle à ce point de transition. En fonction de la phase du cycle cellulaire, les variations d'expression de certains gènes sont caractéristiques de la capacité du parasite soumis au stress à enclencher ou non une conversion vers le stade bradyzoïte. Ainsi, la phase du cycle cellulaire qui voit de grandes variations dans l'expression de ces gènes entre le tachyzoïte en réplification et le tachyzoïte sous stress est révélatrice de la capacité du parasite à s'enkyster. Si ces variations interviennent en phase S/M du cycle cellulaire, le parasite effectuera une conversion vers la forme bradyzoïte. A l'inverse, au sein d'une souche non kystogénique tel que la RH, ces changements sont exprimés en phase G1 (313,314). De même, une analyse du transcriptome par lecture de puces à ADN a démontré la même information (182). Une comparaison entre tachyzoïtes en réplification et tachyzoïtes en cours de différenciation a montré un enrichissement en parasites en phase G0/G1 lorsque le développement des bradyzoïtes a été déclenché (315).

Ces observations ont été réalisées sur des parasites non soumis au stress, ce qui implique que même dans des conditions normales, un certain nombre de facteurs capables d'initier le développement de bradyzoïtes sont présents et en attente d'un signal initiateur du déclenchement de la différenciation. Les tachyzoïtes passeraient donc par un point du cycle cellulaire au cours duquel ils sont prêts à se développer en bradyzoïtes. Si le signal est présent, le parasite enclenche la différenciation vers la forme bradyzoïte, sinon, il poursuit sa réplification en tachyzoïte. Le ou les signaux initiateur(s) n'ont pas encore été clairement identifiés (196) (Figure 19).

4.4.4 Implication de la régulation épigénétique dans la conversion tachyzoïte-bradyzoïte :

Les modifications de la chromatine sont un des moyens de réguler l'expression des gènes, notamment au niveau transcriptionnel. Au cours de la différenciation de tachyzoïte vers la forme bradyzoïte, il a été démontré que les profils d'expression changent profondément (196). En cohérence avec ces changements, plusieurs enzymes catalysant les modifications de la chromatine ont été impliquées dans les mécanismes conduisant à l'établissement des profils d'expression stade spécifique. Une modification a été d'ailleurs particulièrement impliquée dans ces processus : l'acétylation. Il a été démontré que le traitement de tachyzoïtes à l'apicidine, un inhibiteur à large spectre de l'activité histone désacétylase,

provoquait la conversion du tachyzoïte en bradyzoïte (316). Le niveau d'acétylation de la chromatine apparaît donc comme déterminant dans la régulation de l'expression des gènes notamment lors du changement de phase entre tachyzoïte et bradyzoïte (317).

De plus comme énoncé précédemment, d'autres enzymes ont démontré leur implication dans le maintien ou le changement de stade parasitaire : TgHDAC3, TgGCN5a et TgGCN5b dans l'acétylation des histones et les méthyl-transférases TgCARM1, et méthylase TgSet8.

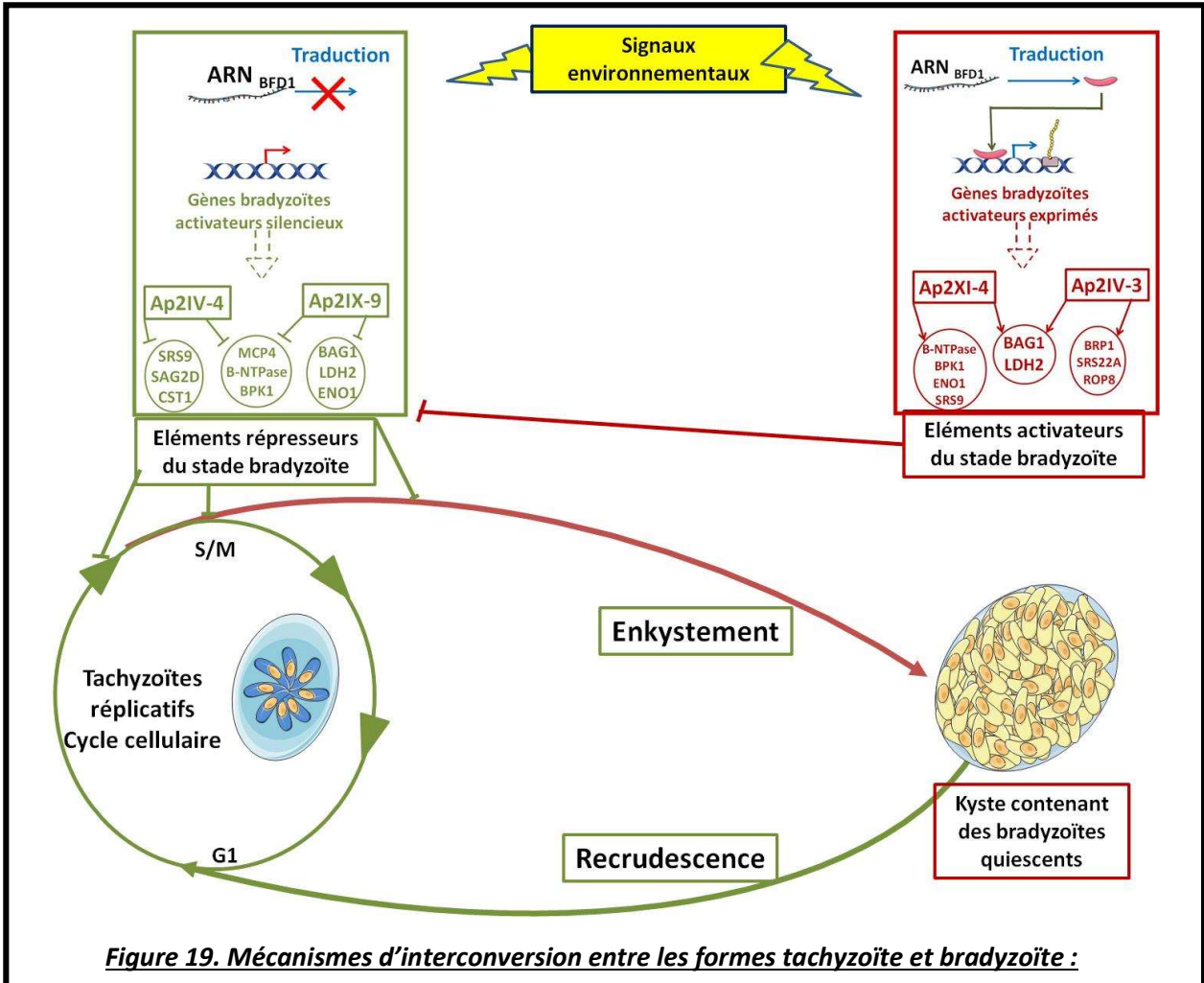


Figure 19. Mécanismes d'interconversion entre les formes tachyzoïte et bradyzoïte :

Le gène *BFD1* est nécessaire pour initier la différenciation. Aux stades tachyzoïte et bradyzoïte, ce gène est transcrit en ARN messager. Cependant, la protéine codée *BFD1* est préférentiellement fabriquée lors d'une infection chronique. *BFD1* est un facteur de transcription qui peut piloter l'expression des gènes nécessaires à la formation des bradyzoïtes tels que certains gènes du réseau transcriptionnel des *ApiAP2*. Les activateurs transcriptionnels *AP2XI-4* et *AP2IV-3* co-régulent les gènes *BAG1* et *LDH2* et régulent indépendamment d'autres gènes bradyzoïtes. De même, les répresseurs transcriptionnels *AP2IV-4* et *AP2IX-9* régulent des ensembles communs (*B-NTPase*, *MCP4*, *BPK1*) et indépendants de gènes bradyzoïtes. Bien que ces *ApiAP2* ne soient pas directement régulés par *BFD1*, il apparaît que l'action de *BFD1* enclenche la cascade d'activation qui aboutit à l'expression de ces facteurs de transcription.

L'implication du « code histone » dans le changement de stade parasitaire apparaît comme essentielle. L'étude de la cartographie des modifications post-traductionnelles des histones et la caractérisation des modifications épigénétiques spécifiques à *T. gondii* et à chaque stade parasitaire permettront d'élucider le mécanisme global de la régulation épigénétique impliqué dans le changement et le maintien de stade parasitaire.

L'étude des bradyzoïtes représente un sujet central dans la compréhension de la pathogenèse causée par *T. gondii* notamment la compréhension de la phase chronique de la maladie pour l'avancée médicale. D'un point de vue médical, la réactivation kystique constitue un risque majeur pour la santé de patients atteints de maladies immunosuppressives ou recevant un traitement immunosuppresseur (ex : antirejet). De plus, la présence potentielle des kystes cérébraux pour plus d'un tiers de la population humaine mondiale ne constitue pas une information rassurante sachant notamment les manipulations comportementales du parasite sur son hôte observées chez le rongeur (318) et la prédisposition potentielle à certaines pathologies mentales ou neurodégénératives (319,320). L'établissement de nouvelles stratégies prophylactiques ou thérapeutiques sont donc indispensables tant concernant les approches médicales humaines que vétérinaires qui sont intimement liées (321).

De nombreuses questions en suspens méritent d'être étudiées afin de mieux comprendre les aspects clés de la biologie des bradyzoïtes, notamment concernant les stratégies d'échappement au système immunitaire développées par le parasite.

Problématique :

Chez l'homme, la différenciation entre tachyzoïte et bradyzoïte est essentielle à la pathogénicité et apparaît donc comme un ensemble de mécanismes d'intérêt thérapeutique. La découverte de nouvelles cibles thérapeutiques constitue un enjeu majeur dans la recherche contre *T. gondii* et plus généralement contre les parasitoses apicomplexes. Les enzymes impliquées dans les régulations épigénétiques des histones sont apparues comme des cibles d'intérêt majeur pour deux raisons principales. La première est que de nombreux composés déjà connus et utilisés dans le traitement d'autres maladies tel que le cancer sont susceptibles d'être réutilisés contre la toxoplasmose (81). La seconde raison est que les mécanismes de régulation des gènes sont essentiels à la pathogénicité et à la faculté d'adaptation du parasite (322). De plus, les régulations épigénétiques des histones sont fortement impliquées dans la transition de stades parasitaires de l'hôte intermédiaire pour lequel aucun traitement n'existe contre la forme enkystée (110,117,244). De plus, le manque de modèles *in vitro* capables de produire des bradyzoïtes matures a impliqué un manque de connaissance sur les variations d'expressions géniques qui régissent le passage entre les tachyzoïtes et bradyzoïtes.

L'objectif des travaux réalisés durant cette thèse est double :

- Identifier de nouveaux inhibiteurs chez *Toxoplasma gondii*. Nous avons ciblé des inhibiteurs impactant des mécanismes de régulation des gènes impliqués dans la transition de stades parasitaires
- Mieux caractériser ces mécanismes impliqués dans la transition de stades et essentiels à la survie du parasite.

Ce travail s'est articulé autour de deux axes donnant lieu à la publication de deux articles :

- La première partie portant sur l'identification et l'étude de l'action d'un inhibiteur d'histones désacétylases sur *T. gondii*.
- Et la seconde sur l'étude de l'évolution de l'expression génique lors du passage de la forme tachyzoïte à bradyzoïte dans un modèle de culture original permettant la différenciation spontanée.

Résultats :

5 A potent HDAC inhibitor blocks Toxoplasma gondii tachyzoite growth and profoundly disrupts parasite gene expression

5.1 Introduction

Pour répondre à un besoin d'identification de nouvelles molécules inhibitrices de *T. gondii*, nous avons testé 6 composés déjà identifiés pour avoir des effets contre un autre parasite apicomplexe, *Plasmodium falciparum* (323), et pouvant impacter la régulation de l'expression des gènes de par leurs cibles potentielles (ciblant les mécanismes épigénétiques).

Nous avons identifié un composé (MC1742) présentant de grandes similitudes avec un inhibiteur d'HDAC et capable d'inhiber la prolifération du parasite sous sa forme répliquative. Afin d'étudier son efficacité et de la comparer à d'autres inhibiteurs connus chez *T. gondii*, nous avons mis au point un nouveau protocole permettant de déterminer rapidement l'IC₅₀ de séries de composés en parallèle. Le composé MC1742 est apparu comme le meilleur inhibiteur de la croissance des tachyzoïtes et présente une IC₅₀ plus basse que la pyriméthamine. Ce composé MC1742 est efficace autant *in vitro* qu'*in vivo*. *In vivo*, l'administration du composé par injections intrapéritonéales permet la survie à une dose létale de parasites chez la souris. Enfin, nous avons déterminé que MC1742 se comporte comme un inhibiteur d'histones désacétylases et provoque une perturbation dans l'expression des gènes du parasite. Notamment, il induit une dérégulation chez le tachyzoïte des gènes spécifiques des stades asexués et sexués qui ont lieu spécifiquement chez les félinés et des gènes spécifiquement exprimés dans les bradyzoïtes.

5.2 Publication

International Journal of Antimicrobial Agents 59 (2022) 106526



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicag



A potent HDAC inhibitor blocks *Toxoplasma gondii* tachyzoite growth and profoundly disrupts parasite gene expression

Thomas Mouveau^a, Dante Rotili^b, Tom Boissavy^a, Emmanuel Roger^a, Christine Pierrot^a, Antonello Mai^b, Mathieu Gissot^{a,*}

^aUniv. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017 - CIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France

^bDipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco "Sapienza" Università di Roma, 00185, Rome, Italy



ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 August 2021

Accepted 8 January 2022

Editor: Dr Bruno Pradines

Keywords:

Toxoplasma
Toxoplasmosis
HDAC
HDAC inhibitors
Malaria
Plasmodium

ABSTRACT

Introduction: Toxoplasmosis is a major health issue worldwide, especially for immune-deficient individuals and the offspring of newly infected mothers. It is caused by a unicellular intracellular parasite called *Toxoplasma gondii*. Although the drugs commonly used to treat toxoplasmosis are efficient, they present serious side effects and adverse events are common. Therefore, there is a need for the discovery of new compounds with potent anti-*Toxoplasma gondii* activity.

Methods: This study tested compounds designed to target enzymes that are involved in the epigenetic regulation of gene expression.

Results: Among the most active compounds, an HDAC inhibitor showing an IC₅₀ of 30 nM with a selectivity index above 100 was identified. MC1742 was active at inhibiting the growth of the parasite in vitro but also at preventing the consequences of the acute disease in vivo. This compound induced hyperacetylation of histones, while the acetylated tubulin level remained unchanged. After MC1742 treatment, the parasite expression profile was profoundly changed with the activation of genes preferentially expressed in the sexual stages that are normally repressed in the tachyzoite stage.

Conclusions: These findings suggest that this compound disturbs the *Toxoplasma gondii* gene expression program, inducing parasite death.

© 2022 Elsevier Ltd and International Society of Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Apicomplexa is a phylum consisting of obligate intracellular protozoan parasites of high transmissibility, which includes various human pathogen species such as *Plasmodium* spp. (causative agent of malaria), *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) (cause of toxoplasmosis) and *Cryptosporidium* spp. (cause of cryptosporidiosis). Although toxoplasmosis is generally asymptomatic in immunocompetent hosts, it can lead to the development of focal central nervous system infections in immunocompromised hosts. *Toxoplasma* is also a clinically important opportunistic pathogen that can cause birth defects or death in the offspring of newly infected mothers and is a threat to immunocompromised individuals. The worldwide seroprevalence of *T. gondii* infection is high and estimated between 30–70% in humans, depending on the geographical areas [1]. The *T. gondii* life cycle is complex, with multiple differentiation

and proliferation steps that are key to parasite survival in human and feline hosts [2]. Infection by oocysts containing sporozoites shed by cats or by bradyzoites contaminating meat leads to differentiation into the rapidly growing tachyzoites that are responsible for the clinical manifestations in humans. The tachyzoites are responsible for the acute phase of the disease and their proliferation is the cause of the disease symptoms in intermediate hosts. The latent bradyzoites are thought to persist in the infected host for prolonged periods, due to their ability to evade the immune system and to resist commonly used drug treatments. Bradyzoites also have the ability to reactivate into virulent tachyzoites and cause encephalitis, particularly in immunocompromised hosts [3]. The current treatment for toxoplasmosis consists of the use of pyrimethamine and sulfadiazine. This combination is active against the tachyzoite form of the parasite and therefore the acute phase of the disease. There are currently no drugs that target the latent form of the parasite. Both pyrimethamine and sulfadiazine target the folate pathway, and therefore folic acid complementation is usually necessary to limit the impact on the patient. This association has long been known to be synergetic for the treatment of toxoplasmosis [4] but the teratogenic effects of pyrimethamine

* Corresponding author: Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017 - CIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France.

E-mail address: mathieu.gissot@pasteur-lille.fr (M. Gissot).

limits its use in pregnant women [5]. Adverse events are associated with this regimen; > 30% of the patients show adverse events leading to treatment discontinuation, among which bone marrow suppression is one of the most serious side effects [6]. Clindamycin is a second-line drug that can replace sulfadiazine in case of patient allergy, but this antibiotic presents a similar adverse event probability and is less efficient at preventing relapse [7]. Taken together, these observations emphasise the need for a better toxoplasmosis treatment.

To address this need, many compounds have been tested against this parasite [8]. Enzymes mediating epigenetic modifications of histones have rapidly appeared as potential targets, since several compounds designed to inhibit these enzymes can be repurposed [8]. In addition, mechanisms of gene regulation are essential to parasite growth [9,10]. Among the epigenetic modifications of chromatin, histone acetylation has undoubtedly been the most pre-eminent target to be tested against *T. gondii* [11] and other parasites [12]. Few compounds potentially inhibiting histone acetyltransferases (HATs) [13,14] and deacetylases (HDACs) [15–19] have been shown to be active against *T. gondii*, indicating that histone acetylation is crucial for tachyzoite survival and therefore a promising therapeutic target. Moreover, most *T. gondii* HAT and HDAC enzymes are essential for in vitro growth of tachyzoites [20].

This study investigated the anti-*T. gondii* activity of compounds that target epigenetic mechanisms and have been shown to be active against *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) [21]. It was demonstrated that a known HDAC inhibitor showed potent activity against the tachyzoite form of this parasite both in vitro and in a mouse model of infection. MC1742 presented a lower IC₅₀ than pyrimethamine and other hydroxamate-based HDAC inhibitors. Treatment with MC1742 strongly increased the level of parasite histone acetylation and profoundly affected gene expression, suggesting a crucial role for histone deacetylation in maintaining the tachyzoite-specific gene expression program.

2. Material and Methods

2.1. Parasite strains and culture

Toxoplasma gondii tachyzoites of the RH, 76K, PTG-LUC-GFP, RH-LUC GFP strains and the two strains bearing the mutated residues T99A and T99I of TgHDAC3 [17] (a gift from Dr Hakimi) were propagated in vitro in human foreskin fibroblasts (HFF, acquired from the American Type Culture Collection) using Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% foetal calf serum, 2 mM glutamine and 1% penicillin-streptomycin. Tachyzoites were grown in ventilated tissue culture flasks at 37°C and 5% CO₂.

2.2. Intracellular growth assays

For intracellular treatment with the compounds, 8×10^4 parasites, at a multiplicity of infection of ca. 2, were inoculated on HFF cells. Parasites were left to invade for 4 hours; the media were then changed and replaced with media containing either dimethylsulfoxide (DMSO) or a chemical compound to be tested. After 24 hours, the coverslips were then fixated using 4% paraformaldehyde (PFA). The parasite nuclei were stained with anti-TgEzo2 (provided by S. Tomavo) and the parasites per vacuole were counted. Quantification of immunofluorescence assays was carried out manually by counting the concerned signal by visual observation. Signal corresponding to 100 vacuoles was counted for each replicate. Three independent experiments were performed.

For extracellular treatment, 8×10^4 parasites were treated for 4 hours with either DMSO or a chemical compound to be tested. The media were then changed and the 8×10^4 parasites were deposited onto HFF cells in a well of a 24-well plate for each condi-

tion. After 24 hours, the coverslips were then fixated using 4% PFA and processed as above.

2.3. Plaque assay

Two hundred parasites were inoculated on HFF cells grown in a six-well plate for 7 days in normal media and media supplemented with the compounds or DMSO. Host cells were fixated with methanol and then stained using a Crystal Violet solution. Three independent experiments were performed.

2.4. Dolichos biflorus lectin labelling

Type II parasites of the 76K strain (8×10^4 parasites) were inoculated on HFF cells. Parasites were left to invade for 4 hours; the media were then changed and replaced with media containing either DMSO or MC1742 (0.5 μM). After 24 hours, the coverslips were then fixated using 4% PFA and stained using *Dolichos biflorus* lectin (FITC, Vector Laboratories). Quantification of immunofluorescence assays was carried out manually by counting the concerned signal by visual observation. Signal corresponding to 100 vacuoles was counted for each replicate. Three independent experiments were performed.

2.5. RNA sample collection and library preparation

RNA samples were collected after infecting HFF cells with the RH strain for 24 hours and then treated for 6 hours with either DMSO or MC1742 (0.5 μM). Parasites were extracted and purified from the host cell before being lysed in Trizol. RNA was extracted as per manufacturer's instruction and genomic DNA was removed using the an RNase-free DNase I Amplification Grade Kit (Sigma). All RNA samples were assessed for quality using an Agilent 2100 Bioanalyzer. RNA samples with an integrity score ≥ 8 were included in the RNA library preparation. Triplicates (biological replicates) were produced for each condition. The TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit (Illumina) was used to prepare the RNA libraries according to the manufacturer's protocol. Library validation was carried out using DNA high-sensitivity chips passed on an Agilent 2100 Bioanalyzer. Library quantification was carried out by quantitative PCR.

2.6. RNA-seq and analysis

Clusters were generated on a flow cell with a cBot using the Cluster Generation Kit (Illumina). Libraries were sequenced as 50 bp-reads on a HiSeq 2500 using the sequence by synthesis technique (Illumina). HiSeq control software and a real-time analysis component were used for image analysis. Illumina's conversion software (bcl2fastq 2.17) was used for demultiplexing. Datasets were aligned with HiSAT2 v2.1.0 [22] against the *T. gondii* ME49 genome from (ToxoDB-39) [23]. Expression for annotated genes was quantified using htseq-count and differential expression measured by DESeq2. *P*-values for multiple testing were adjusted using the Benjamini-Hochberg method. Differentially expressed genes with an adjusted *P*-value < 0.05 and log₂ fold-change > 1 or < -1 were considered in this study. RNA-seq data that supported the findings of this study have been deposited in the GEO database under the accession number GSE175919.

2.7. Quantitative real time PCR (RT-qPCR)

Primers used in the RT-qPCR experiments are the following: SRS48K (TGME49_207010; forward: GATGTGCATGTGTGCTACTA; reverse: GTTTGGGCACTCCTTGA), Gra11b (TGME49_237800; forward: AAAGTACGACGAGGAAGTG; reverse: ATCCCGTGGTCCGATTAT)

and TGME49_277060 (forward: CGTTCTGTTCTCCTGACTATG; reverse: CCTGAACCTCTCACCTTTC). Tachyzoite RNA was isolated using Trizol Reagent, according to manufacturer's protocol, and purified after an RNase-free DNase I Amplification grade treatment. An Agilent 2100 Bioanalyzer was used to assess the integrity of the RNA samples that were then quantified with a NanoVue Plus Spectrophotometer. Total cDNA was generated using the Maxima Reverse Transcriptase kit with 1 µg of total RNA and oligo (dT) in a final volume of 20 µL, as recommended by the manufacturer. RT-qPCR was performed using the SYBR® Selected Master Mix, according to manufacturer's instructions, using 3 µM of each primer and ca. 10 ng of cDNA in nuclease-free water to a final volume of 20 µL. Change in expression of individual genes was represented by relative fold change in the Cq values as $\Delta\Delta Cq$ (*TgTub* served as reference gene).

2.8. ChIP-qPCR

Intracellular parasites of the 76K strain were grown for 24 hours and then treated for 24 hours with 0.5 µM of MC1742 or DMSO. ChIP was performed as previously described [24] using the anti-H4ac antibody (#06-866; Millipore). The input samples were eluted in 30 µL, while the IP samples were eluted in 10 µL. Primers used in the ChIP-qPCR experiments are the following: SRS48K promoter (TGME49_207010; forward: CCGAGACCAGCATTGATT; reverse: AATGGCTTTGCCCTTGTGTTG), Gra11b promoter (TGME49_237800; forward: TCCGACAGGGATCTGTTTC; reverse: TGACTTTGCAACG-CACCTC), TGME49_277060 promoter (forward: CCTTGCATGTGAC-CCCTAT; reverse: GATGGCGAAGGATTGATGT) and ROP16 promoter (forward: CCGTCAGTGGTAGGCTTTT; reverse: TTGGTACGGATCTGCCAAC). ChIP-qPCR was performed using the SYBR Selected Master Mix, according to manufacturer's instructions, using 3 µM of each primer, 1 µL of input and IP DNA to a final volume of 20 µL. Change in the level of H4ac for individual promoter is represented by relative fold change in the Cq values as $\Delta\Delta Cq$ (input served as reference) comparing MC1742 and DMSO treated samples.

2.9. IC₅₀ calculation

To measure the IC₅₀ of each compound, a luminometric assay was performed on a parasitic strain expressing luciferase. Each well of the 96-well plates was infected with 25.10³ parasites. For each compound, 10 concentrations from 2 µM to 1 nM were tested. Each condition was carried out in triplicate. After 24 hours of growth for the type I strain or 40 hours for the type II strain, the plate was washed twice with PBS and 50 µL of lysis buffer (Glo Lysis Buffer, Promega) was added in each well. The plates were then frozen at -80°C for at least an hour. The quantity of parasite was measured by detecting the emission of light after the addition of the luciferase substrate (Luciferase Assay System, Promega) using a SPARK plate reader (TECAN). After thawing the plate, 50 µL of luciferase substrate was automatically injected into each well and then the quantity of light was read for 1 second. The measured values were used to plot a regression curve and calculate the IC₅₀ using Graphpad Prism.

2.10. Mice infections

Animal housing and experimentation were carried out in accordance with the French Council in Animal Care guidelines for the care and use of animals and following the protocols approved by the Institut Pasteur de Lille's ethical committee (number #11082-2017072816548341 v2). Prior to mice infection, intracellular parasites were purified by sequential syringe passage with 17-gauge and 26-gauge needles and filtration through a 3-µm polycarbonate

membrane filter. For studying the acute phase of toxoplasmosis, 6–8-week-old Balb/c mice were infected intraperitoneally using 10⁵ parasites of the 76K strain. One day after infection, the mice were intraperitoneally treated with a dose of MC1742 at a concentration of 10 mg/kg (resuspended in 7% DMSO) or the solvent only (7% DMSO) daily for 7 days. Survival of mice was followed until all apparent signs of disease disappeared. For studying the latent phase of infection, 6–8-week-old Balb/c mice were intraperitoneally infected using 10² parasites of the 76K strain. When studying the effect of the treatment on cyst establishment, the mice were intraperitoneally treated with either DMSO or MC1742 at a dose of 10 mg/kg daily for 7 days, 24 hours after infection. The mice were then left untreated for 4 weeks before being euthanised. When studying the effect of the treatment on the established cysts, the mice were intraperitoneally treated with either DMSO or MC1742 at a dose of 10 mg/kg daily for 7 days, 4 weeks after infection. The mice were then euthanised and their brains were collected and homogenised individually. Cysts were counted after *Dolichol biflorus* lectin (DBA-FITC, Vector Laboratories) labelling of the cyst wall for 30 minutes at room temperature to a dilution of 1:400 in PBS. One-fifth of the brain of each mouse was scored for the presence of lectin-positive cysts.

2.11. Western blot

Intracellular parasites were grown for 24 hours and then treated overnight with 0.5 µM of MC1742 or DMSO. Parasites were then purified from the host cell by sequential syringe passage with 17-gauge and 26-gauge needles and filtration through a 3-µm polycarbonate membrane filter. This enabled collection of parasites that were free from the host-cell material. Parasites were resuspended in 1X Laemmli buffer to prepare the total protein extracts. The protein samples were then fractionated on a 15% SDS-polyacrylamide electrophoresis gel and then transferred onto a nitrocellulose membrane. The antibodies used were: anti-acetylated histone H4K8 (ab15823; 1:1000); anti-acetylated histone H3K9 (ab4441; 1:1000); anti-histone H3 targeted at the C-terminus (07-690 EMD; 1:5000); anti-tri-methylated histone H3K4 (ab8580; 1:1000); anti-acetylated tubulin (T7451; 1:10000); and anti-alpha tubulin (GTX628802; 1:1000). Chemiluminescent detection of bands was carried out using Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate.

2.12. Statistics and reproducibility

All data were analysed with GraphPad Prism software version 8 (San Diego, California, USA). Differences in the means were assessed by Student's *t* test. Differences in survival curves were assessed by a Log-rank (Mantel-Cox) test. In all cases, *P*-values were two-sided and *P* < 0.05 was considered as significant. All experiments were repeated at least three times using biologically independent replicates.

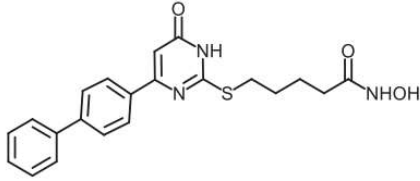
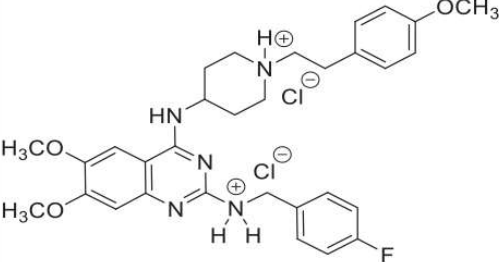
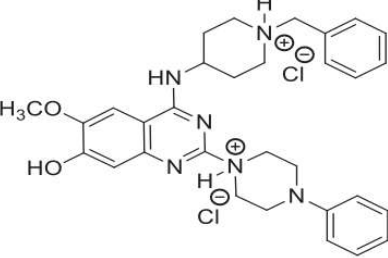
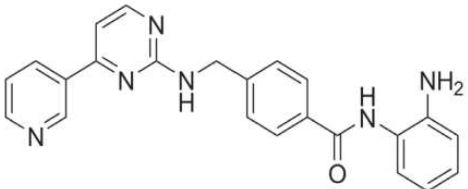
3. Results

3.1. Compounds potentially active against epigenetic enzymes inhibited tachyzoite growth

The anti-*T. gondii* activity of four compounds that potentially targeted enzymes involved in chromatin modification was tested (Table 1). Two compounds had potential anti-HDAC activity (MC1742 and Mocetinostat) and two compounds were potentially targeted at DNA methylation (MC3681 and MC3973).

To test the anti-*T. gondii* activity of these compounds, their ability to inhibit the parasite proliferation in vitro was first investigated. The parasites were treated while intracellular with three

Table 1
Name, structure and potential target of the compounds tested.

Compounds	Molecular Structure	Potential target
MC1742		Histone Deacetylase (class I/IIb HDAC)
MC3973		DNA methyl-transferase
MC3681		DNA methyl-transferase
Mocetinostat		Histone Deacetylase (HDAC)

different concentrations of compounds (Figure 1A). The parasites were left to invade the host cells for 4 hours and then treated with the compounds at different concentrations during 24 hours. The number of parasites per vacuole was then recorded as a measurement of their ability to grow intracellularly in the presence of the compounds. In the presence of DMSO (solvent used to dissolve the compounds), the parasites were able to grow to a mean of nine parasites per vacuole. Pyrimethamine was used as a positive control, which was able to ablate most of the intra-

cellular growth (mean parasite per vacuole: 1.34). All the tested compounds showed a similar inhibitory effect at 10 μM . However, MC1742 was able to inhibit the parasite growth at a concentration of 1 μM (Figure 1A), indicating that this compound may be as efficient as the reference pyrimethamine treatment to inhibit intracellular growth.

The action of these compounds to inhibit the parasite in its extracellular form was also investigated. To this end, the extracellular parasites were treated with different compound concentrations

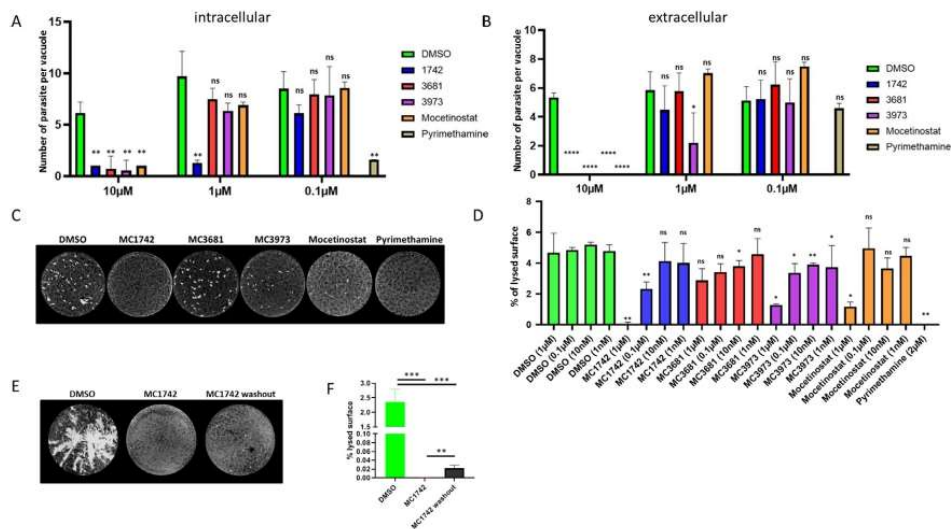


Figure 1. Compounds potentially active against epigenetic enzymes inhibit tachyzoite growth. (A) Effect of intracellular treatment of tachyzoites on intracellular growth. Tachyzoite intracellular growth was measured after 24 hours of exposure to different compounds at different concentrations (10, 1 and 0.1 μM). The average number of parasites per vacuole was used as a metric of parasite intracellular growth. Parasites treated with DMSO (green bars) were used as a control. The effect of MC1742 (blue bars), MC3681 (red bars), MC3973 (pink bars), Mocetinostat (orange bars) and Pyrimethamine (brown bar, 2 μM) on intracellular growth was measured. The concentrations used for each drug are indicated on the x-axis. A Student's *t* test was performed with the DMSO as control; two-tailed *P*-value; ns: $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; mean \pm SD ($n = 3$ independent experiments). (B) Effect of extracellular treatment of tachyzoites on intracellular growth. Tachyzoites intracellular growth was measured after 4 hours of extracellular exposure to different compounds at different concentrations (10, 1 and 0.1 μM). The average number of parasites per vacuole was used as a metric of parasite intracellular growth. Parasites treated by DMSO (green bars) were used as a control. The effect of MC1742 (blue bars), MC3681 (red bars), MC3973 (pink bars), Mocetinostat (orange bars) and Pyrimethamine (brown bar, 2 μM) on intracellular growth was measured. The concentrations used for each drug are indicated on the x-axis. A Student's *t* test was performed with the DMSO as control; two-tailed *P*-value; ns: $P > 0.05$; * $P < 0.05$; **** $P < 0.0001$; mean \pm SD ($n = 3$ independent experiments). (C) Representative pictures of plaque assays after exposure to 1 μM of the compound. The name of the compound is indicated at top of each picture. (D) Quantification of the percentage of lysed surface on plaque assays. Plaque formation was observed after 7 days of exposure to different compounds at different concentrations (1, 0.1 and 0.01 μM). The percentage of lysed surface on the plaque assay was used as a metric of parasite growth and invasion ability. Parasites treated by DMSO (green bars) were used as a control. The effect of MC1742 (blue bars), MC3681 (red bars), MC3973 (pink bars), Mocetinostat (orange bars), and Pyrimethamine (brown bar, 2 μM) on plaque formation was measured. The name of the compound and concentrations used for each drug are indicated on the x-axis. A Student's *t* test was performed with the DMSO as control; two-tailed *P*-value; ns: $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; mean \pm SD ($n = 3$ independent experiments). (E) Representative pictures of plaque assays after exposure to DMSO, 1 μM of MC1742 or 1 μM of MC1742 for 2 days and washout. (F) Quantification of the percentage of lysed surface on plaque assays. Parasites treated by DMSO (green bars) were used as a control. The effect of MC1742 continuous exposure (blue bars) after 8 days, or a washout experiment when parasites were exposed to MC1742 (1 μM) for 2 days and then the compound was washed-out and replaced by fresh media for 6 days (black bar, 2 μM) was measured on plaque formation. A Student's *t* test was performed with the DMSO as control; two-tailed *P*-value; *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; mean \pm SD ($n = 3$ independent experiments).

for 4 hours, which were washed away and these parasites were left to grow for 24 hours (Figure 1B). The number of parasites per vacuole was recorded as a measurement of the compound activity. As expected, DMSO and pyrimethamine led to a mean growth of five parasites per vacuole. Indeed, pyrimethamine is a known inhibitor of intracellular growth and is not active when the parasites are treated extracellularly [25]. Treating the parasites in their extracellular form did not significantly affect their ability to grow inside the cell, with the exception of MC3973; this compound potentially targeting DNA methyl-transferases showed an effect at a concentration of 1 μM (Figure 1B).

To investigate the ability of these parasites to grow in the presence of the inhibitors during a 7-day period, a plaque assay was performed that measured the ability of the parasite to grow and invade the host cells for several cycles (Figures 1C and 1D). The percentage of the lysed surface on each well of the plaque assay was determined to assess the inhibitory activity of these compounds. In this experiment, pyrimethamine and MC1742 were able to totally abrogate the presence of plaques (Figure 1C). Most of the compounds were active at 1 μM but had little to no effect at lower concentrations, except for MC1742, which was still active at 0.1 μM (Figure 1D).

3.1.1. Compounds potentially active against epigenetic enzymes presented an IC_{50} ranging from the micromolar to the nanomolar

To precisely measure the IC_{50} of these compounds, a new assay was designed using luciferase expressing parasites. This assay was performed in 96-well plates using bioluminescent type I or type II parasites [26]. The IC_{50} of the compounds was quantified and it was found that MC1742 was able to inhibit the growth of tachyzoites at a much lower concentration than the other compounds (Table 2). Of note, the calculated IC_{50} was similar for both type I and type II parasites, indicating that the inhibitory effect was comparable irrespective of the parasite strain used (Table 2). The selectivity index (SI) of some of these compounds was also calculated and it was found that MC1742 presented an $\text{SI} > 100$, while other compounds showed an $\text{SI} < 10$. Overall, MC1742 was the most efficient compound on tachyzoite growth and presented an attractive selectivity index (Table 2).

The inhibitory activity of MC1742 was compared with pyrimethamine and other known HDAC inhibitors. Trichostatin A, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) and Scriptaid are hydromate-based HDAC inhibitors, while Apicidin is a tetracyclic peptide HDAC inhibitor known to inhibit *T. gondii* growth [15]. The IC_{50} of these drugs was measured in parallel (Table 3). Other HDAC

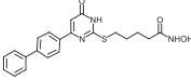
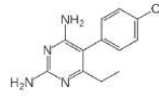
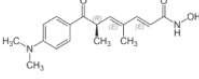
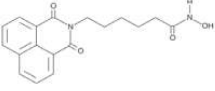

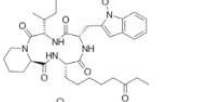
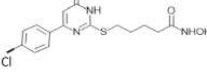
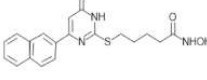
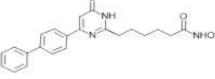
Table 2

IC₅₀ of the compounds in Type I and Type II strains. The IC₅₀ on each *Toxoplasma gondii* strain was determined in at least three independent experiments. (1) IC₅₀ in human fibroblasts (HFF cells) was determined in [21]. (2) Selectivity index was calculated based on the IC₅₀ of the Type II strain.

	MC1742	MC3681	MC3973	Mocetinostat
Type I IC ₅₀ (nM)	34 ± 3	1447 ± 992	552 ± 390	365 ± 101
Type II IC ₅₀ (nM)	30 ± 8	1786 ± 904	512 ± 93	472 ± 270
HFF IC ₅₀ (nM)	3295 ± 247 ⁽¹⁾	7210 ± 14 ⁽¹⁾	3215 ± 389 ⁽¹⁾	ND
Selectivity index ⁽²⁾	109	4	6	ND

Table 3

IC₅₀ of selected hydroxamate-based compounds, apicidin and pyrimethamine.

Compounds	Structures	IC ₅₀ (nM)
MC1742		30 ± 8 nM
Pyrimethamine		660 ± 230 nM
Trichostatin A		176 ± 16 nM
Scriptaid		316 ± 143 nM
SAHA		247 ± 137 nM
APICIDIN		14 ± 2 nM
MC1714		748 ± 220 nM
MC1745		374 ± 20 nM
MC2026		501 ± 166 nM

inhibitor compounds that presented a similar chemical structure to MC1742 were also included in the assay (MC1714, MC1745 and MC2026; Table 3). Overall, MC1742 was the most effective compound and presented IC₅₀ values that were 10 times smaller than pyrimethamine (Table 3).

3.1.2. MC1742 was effective at preventing acute disease but failed to reduce the cyst burden

Having demonstrated that MC1742 was a very potent inhibitor of parasite growth in vitro, its ability to prevent the outcome of the acute disease was assessed in a mouse model. Balb/c mice were

infected with a lethal dose of type II strain. The survival of mice was recorded for 15 days (Figure 2A). Mice were treated daily for 7 days with a dose of 10 mg/kg of MC1742 or DMSO for the control group. Whilst the survival rate of the control group was 6% (n = 32), > 80% (n = 32) of the mice survived in the treated group, indicating that MC1742 was efficient at preventing the outcome of acute disease in this mouse model (Figure 2A).

To test the effect of the molecule on the established chronic form of the parasite, mice were injected with a sub-lethal dose of type II parasites and left untreated for 4 weeks. They were subsequently treated daily for 7 days with a dose of 10 mg/kg of MC1742

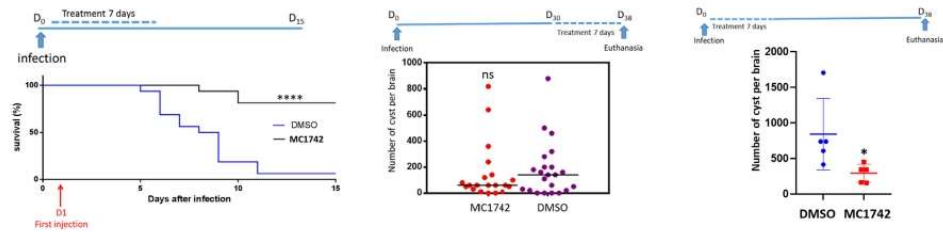


Figure 2. Effect of MC1742 on the outcome of the acute and latent toxoplasmosis. (A) Effect of MC1742 treatment on the outcome of acute disease. Tachyzoites were injected intraperitoneally and mice were treated 24 hours after infection with 10 mg/kg MC1742 once a day for 7 days. The percentage of mice surviving the lethal dose of Type II tachyzoites is represented for each day during 15 days. Mice treated with DMSO (same regimen, blue line) were used as a control. The percentage of surviving mice after treatment with MC1742 is indicated by a black line. A schematic representation of the experiment is indicated at the top of the figure. A Log-rank (Mantel-Cox) test was performed; **** $P < 0.0001$; mean \pm SD ($n = 32$ mice per group). (B) Effect of MC1742 treatment on the latent form of the parasite. Tachyzoites were injected intraperitoneally and mice were left for 4 weeks. Mice were then treated with 10 mg/kg MC1742 once a day for 7 days. A schematic representation of the experiment is indicated at the top of the figure. The number of cysts per brain is represented for each mouse. Mice treated with DMSO (same regimen, purple dots) were used as a control. The number of cysts per brain after treatment with MC1742 is indicated by red dots. A Student's t test was performed; two-tailed P -value; ns: $P > 0.05$ ($n = 20$ mice per group). (C) Effect of MC1742 treatment on the establishment of the latent form of the parasite. Tachyzoites were injected intraperitoneally and mice were treated 24 hours after infection with 10 mg/kg MC1742 once a day for 7 days. Four weeks after the end of the treatment, the brain cyst number for each individual was counted. A schematic representation of the experiment is indicated at the top of the figure. The number of cysts per brain is represented for each mouse. Mice treated with DMSO (same regimen, purple dots) were used as a control. The number of cysts per brain after treatment with MC1742 is indicated by red dots. A Student's t test was performed; two-tailed P -value; * $P < 0.05$ ($n = 5$ mice per group).

or vehicle (DMSO) as control. The mice brains were then collected and the number of cysts per brain was measured (Figure 2B). The recorded cyst numbers were similar in both MC1742-treated and DMSO-treated mice, indicating that MC1742 failed to reduce the established cyst burden with this regimen (Figure 2B).

To test the effect of the molecule on the establishment of the chronic form of the parasite, mice were injected with a sub-lethal dose of type II parasites and subsequently treated daily for 7 days with a dose of 10 mg/kg of MC1742 or vehicle (DMSO) as control. The mice brains were then collected and the number of cysts per brain was measured (Figure 2C). The recorded cyst numbers were smaller in the MC1742-treated mice when compared with the control group, indicating that MC1742 treatment reduced the establishment of cysts, probably by reducing the number of tachyzoites at the beginning of infection (Figure 2C).

3.1.3. MC1742 was a potent inhibitor of the parasite HDACs

MC1742 is known to inhibit human HDACs of class I/IIb [27]. To assess the ability of MC1742 in inhibiting the *T. gondii* HDACs, the relative level of acetylation of several parasite histones was assessed. The parasite was treated with MC1742 or DMSO and specific antibodies were used to measure the relative level of acetylation of histone H4 at the lysine 8 position (H4K8ac, Figure 3A) and histone H3 at the lysine 9 position (H3K9ac, Figure 3B). As control, it was verified that the level of the histone H3 (Figure 3C) and the level of methylation of histone H3 at the lysine 4 position (H3K4me3) were unchanged (Figure 3D). These experiments showed that the level of histone acetylation was strongly enhanced in the presence of MC1742, while the level of H3K4me3 was unchanged (Figure 3E). Whether the acetylation level of non-histone proteins was affected by the MC1742 treatment was also verified. For that purpose, the level of acetylation of α -tubulin at the lysine 40 position was measured by western blot after MC1742 treatment (Figure 3F) and showed that there were no significant changes between the DMSO and MC1742 treatment (Figure 3G). This showed that MC1742 inhibits the parasite HDACs that specifically deacetylate histones.

3.1.4. MC1742 profoundly perturbed the tachyzoite expression program

To determine how MC1742 might influence parasite gene expression, the changes in the tachyzoite transcriptome after MC1742 treatment were measured using RNA-seq. Parasites were left to

grow during 24 hours and then treated with either DMSO or MC1742 for 6 hours. A P -value cut-off of 0.05 and a minimum two-fold change were used to identify differentially expressed genes (DEGs) using the DESEQ2 program. The differential gene expression was represented using a volcano plot (Figure 4A), which clearly shows that the majority of DEGs are upregulated transcripts after 6 hours of MC1742 treatment. Indeed, 1671 genes were found to be upregulated, while 592 were found to be downregulated. The expression of three transcripts that were upregulated in the presence of MC1742 was verified using RT-qPCR and the results were confirmed by RNA-seq (Figure 4B). Relative enrichment of acetylated histone 4 at the promoter of genes that were upregulated after MC1742 treatment (SRS48K, Gra11b, TGME49_277060) and a control locus (ROP16 promoter) with unchanged expression after MC1742 treatment were also verified (Figure 3C). A ratio of the relative H4ac enrichment when compared with the samples treated by MC1742 and DMSO was produced. This data revealed the presence of up to six times more H4ac enrichment at the promoter of the selected genes than identified as upregulated (Figure 4C). To better assess the nature of the upregulated or downregulated genes, a heat-map representing the expression of each individual gene expression during the life cycle of *T. gondii* based on previously published results was produced [28]. It was first observed that the downregulated genes were mainly expressed during the tachyzoite stage (Figure 4D). In contrast, the upregulated genes were preferentially expressed during the sexual cycle in the definitive host and to a lesser extent at the bradyzoite stage (Figure 4E). These data indicate that MC1742 treatment induces the expression of genes that are normally not expressed at the tachyzoite stage. These genes are preferentially expressed during the sexual cycle, as exemplified by Gra11b (Figure 4B).

3.1.5. MC1742 induced expression profile changes that closely reassembled those induced by TgHDAC3 inhibition

The expression profiling performed using RNA-seq highlighted the particular expression profile induced after the treatment of tachyzoites with MC1742. This expression profile was compared with previously published data that reported the transcriptome changes of tachyzoites in a TgMORC mutant [29] or after treatment of the parasite with the TgHDAC3-specific inhibitor FR235222 [17]. TgMORC closely associates with TgHDAC3 and enables its binding to DNA [29]. The expression profile of the TgMORC mutant was first compared with the one induced by MC1742 treatment

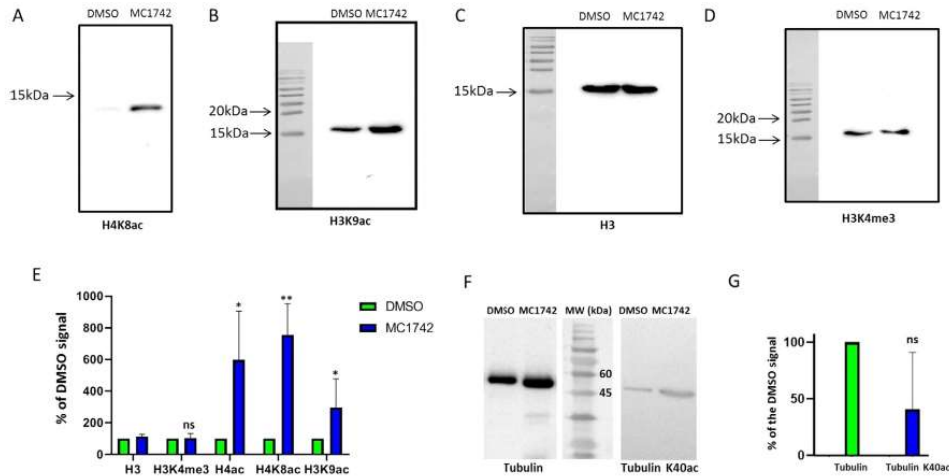


Figure 3. Hyper-acylation of *Toxoplasma gondii* histones after treatment with MC1742. The purified parasite samples were either treated with DMSO or MC1742, as indicated at the top of each western blot. The molecular weight marker is indicated on the left side of the figure. The specific antibody used to reveal the relative abundance of the targeted histones is indicated at the bottom of the figure. (A) Western blot analysis of the acetylated histone H4 at the Lysine 8 residue. (B) Western blot analysis of the acetylated histone H3 at the Lysine 9 residue. (C) Western blot analysis of the histone H3 (modified and unmodified; antibody targeting the C-terminus of histone H3) was used as an internal loading control. (D) Western blot analysis of the trimethylated histone H3 at the Lysine 4 residue. (E) Quantification of the signal for each indicated modified histone after treatment with DMSO (green bars) or MC1742 (blue bars). The signal was normalised to the signal given by the loading control (histone H3, modified and unmodified). A Student's *t* test was performed; two-tailed *P*-value; ns: $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; mean \pm SD ($n = 3$ independent experiments). (F) Western blot analysis of the unmodified alpha tubulin and acetylated tubulin at the lysine 40. The molecular weight marker sizes are indicated. (G) Quantification of the signal for the acetylated tubulin normalised to the level of unmodified tubulin after treatment with DMSO (green bars) or MC1742 (blue bars). A Student's *t* test was performed; two-tailed *P*-value; ns: $P > 0.05$; mean \pm SD ($n = 3$ independent experiments).

(Figure 5A). It showed that $> 80\%$ of the genes upregulated after MC1742 treatment overlap with the genes upregulated in the TgMORC mutant (Figure 5A). In contrast, $< 1\%$ of the genes downregulated after MC1742 treatment overlap with the genes upregulated in the TgMORC mutant (Figure 5A). The list of upregulated genes in the absence of TgMORC was then compared with the one induced by MC1742 treatment or by the TgHDAC3-specific inhibitor FR235222 (Figure 5B). Similar results were found with an overlap of $> 70\%$ between the expression profile induced by MC1742 treatment or by the TgHDAC3-specific inhibitor FR235222 (Figure 5B). These data underline that both inhibitors and the absence of MORC produce a very similar expression profile that may be partly due to the inhibition of TgHDAC3. To further investigate TgHDAC3 as a potential target for MC1742, this compound was tested on two mutant strains bearing a mutation on TgHDAC3 that increases the strain resistance to the TgHDAC3-specific inhibitor FR235222 [17] (Figure 5C). When comparing the growth ability at different concentrations (from 100 nM to 750 μ M), no significant difference in growth was identified, indicating that these mutations are insufficient to confer resistance to MC1742.

It was also checked whether MC1742 was able to induce tachyzoite to bradyzoite differentiation, by measuring the percentage of the *Dolichos biflorus* lectin labelled vacuole after 24 hours of MC1742 treatment (Figure 5D). The TgHDAC3-specific inhibitor FR235222 was shown to induce differentiation [17]. The treatment of tachyzoites of a type II strain with MC1742 did not induced differentiation (Figure 5D), suggesting that different mechanisms are at play during the inhibition of growth by these two compounds.

4. Discussion

This study explored the anti-*T. gondii* activity of compounds targeting epigenetic mechanisms. Gene regulation is crucial for controlling the establishment of expression profiles and adapting to changing environments during the life cycle of the para-

site [10]. Numerous enzymes that can modify or remodel chromatin have been identified in the *T. gondii* genome [30]. Their putative essential role during the parasite life cycle and the possibility of drug repurposing designate them as attractive drug targets. Inhibiting these enzymes to abrogate parasite proliferation has been employed in *T. gondii* and other apicomplexan parasites [21]. The current study tested compounds potentially targeting a variety of enzymes (Table 1). Surprisingly, MC3681 and MC3973, two compounds targeting DNA methyl-transferases, were able to prevent parasite growth, although at a high concentration (10 μ M). *T. gondii* has been shown to lack detectable DNA methylation at the tachyzoite stage [31]. Therefore, it is most likely that this inhibitor at this high concentration may target other enzymatic activities, such as RNA methylation, that have been shown to be essential for parasite survival [32,33]. The cytotoxic effect on host cells at 10 μ M (Table 2) may also explain the results presented in Figure 1 for these two compounds. MC3681 has been shown to be active against *P. falciparum* and *Plasmodium berghei* at much lower concentrations [21], in line with the biological relevance of DNA methylation in these parasites [34]. Therefore, DNA methylation should not be regarded as an important target in *T. gondii*, in contrast to other apicomplexan parasites such as *P. falciparum*.

MC1742 was the most effective compound tested in this study. It was effective at inhibiting growth in vitro, showing an IC_{50} that was lower than pyrimethamine and other hydroxamate-based compounds. However, Apicidin, a tetracyclic peptide HDAC inhibitor, showed a better IC_{50} than MC1742 in vitro. Hydroxamate-based compounds have been investigated as potential HDAC inhibitors in parasites [12]; they are potent inhibitors of the parasite enzymes and present attractive selectivity indexes [12]. MC1742 is another example of the importance of the enzymatic activities carried out by HDACs for the survival of apicomplexan parasites in vitro. Further research to improve the MC1742 compound may focus on increasing its anti-*T. gondii* activity and bioavailability. MC1742 was also effective at preventing the outcome of the acute

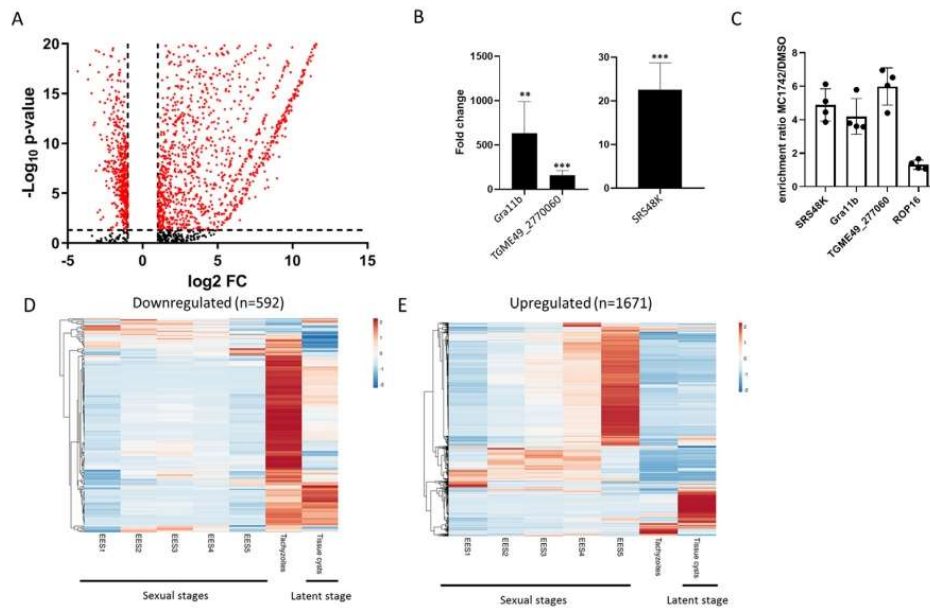


Figure 4. RNA-seq reveals the profound transcriptome changes after MC1742 treatment. Samples were prepared by treating intracellular parasites (24 hours of growth) for 6 hours with DMSO or MC1742. (A) Volcano plot representing the distribution of the differentially expressed genes depending on their \log_2 fold change ($\log_2 \text{FC}$, x-axis) and the associated $-\log_{10} P$ -value (y-axis). The horizontal dashed line represents the P -value cut-off (0.05) and the two vertical dashed lines represent the \log_2 fold change cut-off (1 or -1). Black dots represent genes that did not meet the P -value cut-off. Red dots represent genes that met both cut-offs. For clarity, genes that did not meet the \log_2 fold change cut-off are not represented. The differential expression analysis was based on three independent biological experiments. (B) Verification by RT-qPCR of the expression of three genes that are upregulated after treatment by MC1742. The \log_2 fold change measured by RT-qPCR is represented. A Student's t test was performed with the DMSO as control; two-tailed P -value; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; mean \pm SD ($n = 3$ independent experiments). (C) Verification by ChIP and qPCR of the enrichment of H4ac at the promoter of three genes that are upregulated after treatment by MC1742 (SRS48K, Gra11b, TGME49_277060) and a control locus (ROP16 promoter). The relative enrichment of H4ac at the tested promoter is represented as a ratio of the signal given by the MC1742 treated sample to the DMSO treated sample. (D) Heat map showing the expression during the *T. gondii* life cycle of all individual transcripts that are downregulated ($n = 592$) in the presence MC1742. The different sexual (EES1 to EES5) and asexual (tachyzoites and tissue cysts) stages are indicated at the bottom of the figure. Data extracted from ToxoDB (www.toxodb.org) that was originally produced by Ramakrishnan et al. [28]. (E) Heat map showing the expression during the *T. gondii* life cycle of all individual transcripts that were upregulated ($n = 1671$) in the presence MC1742. The different sexual (EES1 to EES5) and asexual (tachyzoites and tissue cysts) stages are indicated at the bottom of the figure. Data extracted from ToxoDB (www.toxodb.org) that was originally produced by Ramakrishnan et al. [28].

disease. Surprisingly, MC1742 showed an IC_{50} in the low nanomolar range against *P. falciparum* but was unable to inhibit the growth of the parasite in vivo [21], whichever the administration route (intravenous or by oral gavage) employed; this might have been due to the bioavailability of the compound in the blood. However, pharmacokinetics studies revealed that MC1742 concentration in the serum of mice was as high as 10 μM , 30 minutes after intra-venous injection with 50 mg/kg of the compound [21]. In contrast, MC1742 has a strong activity in vitro and in vivo to prevent the outcome of acute toxoplasmosis. Treating the mice during the acute phase also reduced the brain cyst burden; however, it was most likely due to the activity of the compound against tachyzoites. MC1742 was not active against the parasite on established cysts; this may be due to the low penetration/availability and accumulation/concentration of the molecule in the brain where bradyzoite cysts reside. Indeed, the blood-brain barrier could filter away the compound. Alternatively, the cyst wall may be impermeable enough to shield the bradyzoites from the compound. Also, the compound may not be active against the bradyzoite stage that divides at a slower pace than tachyzoites. There are currently no drugs available to treat established bradyzoite infection and only a few compounds have been shown to reduce the cyst burden [35,36]. There is a need to develop new in vitro systems that would enable the testing of compounds against bradyzoites. Organoids or primary brain or muscle cell in vitro culture may open this new research avenue [37].

This study investigated the molecular pathways that were targeted by the MC1742 inhibitor. It showed that histone deacetylation is the primary target of the compound, with little to no effect on tubulin acetylation or histone methylation. This is in line with the expression profile that was found to be profoundly changed after a 6-hour treatment with MC1742, as measured by RNA-seq. In good concordance with the increased level of acetylation of histones in the treated parasites, a dramatic increase in expression of transcripts that are not expressed in normal conditions in tachyzoites (up-regulation in the treated group) was observed. In particular, the upregulation of number of genes whose expression is normally restricted to the sexual stages that occur in the feline host (definitive host) was observed. A good example is the *TgGRA11b* transcript, whose expression is normally restricted to merozoites [38]. The current study also verified the level enrichment of acetylated histones at the promoter of selected transcripts. An increased level of histone acetylation at the promoter of the genes that were upregulated after 1742 treatment was reported. This indicates that the repression of gene expression in tachyzoites is directly under control of the acetylation level of histones. Therefore, an increased level of histone acetylation is sufficient to promote the expression of genes that are normally repressed at this stage. Of note, the level of histone methylation seemed to be unchanged by MC1742 treatment as measured by western blot. This indicates that there might be a limited interplay between the global level of histone acetylation and the global level

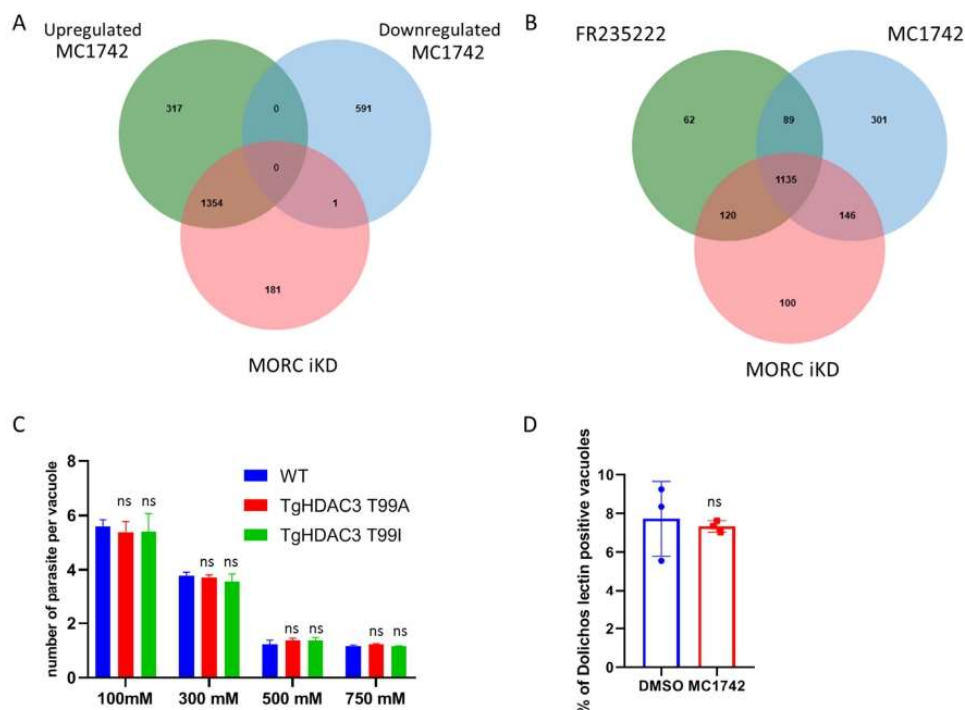


Figure 5. RNA-seq showed that MC1742 potential target may be TgHDAC3. The list of differentially expressed genes was extracted from [29] and compared with the list of differentially expressed genes from the dataset. (A) Comparison of the differentially expressed genes that were upregulated (green circle) or downregulated (blue circle) after exposure to MC1742. The upregulated genes after TgMORC knock-down (red circle) are represented in this Venn diagram. (B) Comparison of the differentially expressed genes that were upregulated (green circle) after FR235222 treatment (a specific inhibitor of TgHDAC3), upregulated after MC1742 treatment (blue circle) and the upregulated genes after TgMORC knock-down (red circle) showing a large overlap between these three datasets. (C) Tachyzoite intracellular growth was measured after 24 hours of exposure to MC1742 at different concentrations for the WT and FR235222-resistant strains bearing a mutation on TgHDAC3 (T99A or T99I). The average number of parasites per vacuole was used as a metric of parasite intracellular growth. The effect of MC1742 on the WT (blue bars), TgHDAC3 T99A (red bars) and TgHDAC3 T99I (green bars) strains was measured. The MC1742 concentrations (nM) used are indicated on the x-axis. A Student's *t* test was performed with the DMSO as control; two-tailed *P*-value; ns: $P > 0.05$; mean \pm SD ($n = 2$ independent experiments). (D) Percentage of vacuoles labelled with *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA). Tachyzoites of a type II strain were grown for 24 hours in the presence of 0.5 μ M MC1742 and the number of vacuoles positive for DBA labelling was counted. A Student's *t* test was performed with the DMSO as control; two-tailed *P*-value; ns: $P > 0.05$; mean \pm SD ($n = 3$ independent experiments).

of histone methylation, even though both H3K9ac and H3K4me3 are present at active promoters in tachyzoites [24]. In summary, inhibition of the parasite HDAC indicates that the level of histone acetylation may be the major determinant for the activation or repression of gene expression in *T. gondii* tachyzoites.

Cell cycle defects were recently shown to occur in *T. gondii* tachyzoites treated with hydroxamate-based compounds [19]. The current study observed a drastic effect on the growth of parasites treated by MC1742. In particular, these parasites were unable to proceed with the normal cell cycle, since vacuoles with one parasite were pre-eminent after 24 hours of treatment. This indicates that similar cell cycle defects probably occur in MC1742-treated parasites. It was noticed that Cdk-related kinases (TgCrk2-L1 and TgCrk5-L1) [39], that are normally specifically expressed in merozoites, were overexpressed after MC1742 treatment. Notably, the expression of these kinases may be sufficient to induce cell cycle defects. However, it is difficult to pinpoint the effect of individual genes when > 1000 transcripts are expressed at a stage they should not be.

Toxoplasma gondii encodes five potential HDACs (TgHDAC1–5), which are expressed at the tachyzoite stage [11] and could in principle be targeted by MC1742. This compound is described as human class I/IIb HDAC inhibitor [27] and therefore could inhibit the activity of any of these enzymes. To try to learn more

about the potential target of MC1742, the current study compared RNA-seq results that were obtained by a specific TgHDAC3 inhibitor (FR235222) [17] or by inhibiting the binding of TgHDAC3 to chromatin (TgMORC mutant) [29]. The high overlap of the expression profile, with $> 70\%$ or 80% , respectively, between these two datasets and the RNA-seq results presented here suggests that the potential target of MC1742 may also be TgHDAC3. However, it cannot be excluded that the activity of other HDACs was affected by the compound. The generation of a strain resistant to MC1742 might have been a way to confirm this hypothesis. Unfortunately, such a mutant strain was unable to be produced after several attempts (data not shown). To better assess TgHDAC3 as a potential target of MC1742, the effect of the compound was tested on two strains that carry a mutation of TgHDAC3 that elicits resistance to the FR235222 compound [17]; however, these strains exhibited comparable growth at different concentrations of MC1742. This may indicate that the resistance mechanism is different for the two compounds. The different structure of the compounds cyclopeptide FR235222 and hydroxamate-based MC1742 may also explain why the induced mutation did not confer increased resistance to MC1742. Therefore, this experiment did not draw definitive conclusion on the identity of the MC1742 targets. Since MC1742 does not induce the expression of TgCST1 (as measured by DBA labelling), this suggests that this compound has different mechanisms of ac-

tion to FR235222, which was shown to strongly induce differentiation. However, MC1742 treatment results in very comparable dysregulation of gene expression to FR235222 at the tachyzoite stage.

In conclusion, this study identified an HDAC inhibitor that shows a potent anti-*T. gondii* activity in vitro and in vivo in a mouse model of the acute disease. MC1742 treatment profoundly perturbed the normal tachyzoite expression profile and potentially targeted the activity of TgHDAC3 and other HDACs. Overall, MC1742 is a promising compound for future treatment of the acute phase of toxoplasmosis.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr Jamal Khalife for critically reading the manuscript and Dr Hakimi for providing the TgHDAC3 mutant strains. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (inserm) and the Région Haut de France.

Funding

No funding.

Competing Interests

None.

Ethical Approval

Not required.

References

- Montoya JG, Toxoplasmosis Liesenfeld O. Lancet Lond Engl 2004;363:1965–76.
- Kim K, Weiss LM. Toxoplasma gondii: the model apicomplexan. Int J Parasitol 2004;34:423–32.
- Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. Immunology of Toxoplasma gondii. Immunol Rev 2011;240:269–85.
- Eyles DE, Coleman N. An evaluation of the curative effects of pyrimethamine and sulfadiazine, alone and in combination, on experimental mouse toxoplasmosis. Antimicrob Chemother Northfield Ill 1955;5:529–39.
- Hickl EJ, Mohr U, Martius G. [Animal experimental studies on the problem of fetal damage by pyrimethamine]. Arch Gynakol 1964;199:634–40.
- Ben-Harari RR, Goodwin E, Casoy J. Adverse Event Profile of Pyrimethamine-Based Therapy in Toxoplasmosis: A Systematic Review. Drugs RD 2017;17:523–44.
- Katlama C, De Wit S, O'Doherty E, Van Glabeke M, Clumeck N. Pyrimethamine-clindamycin vs. pyrimethamine-sulfadiazine as acute and long-term therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 1996;22:268–75.
- Alday PH, Doggett JS. Drugs in development for toxoplasmosis: advances, challenges, and current status. Drug Des Devel Ther 2017;11:273–93.
- Gissot M, Kim K, Schaap D, Ajioka JW. New eukaryotic systematics: a phylogenetic perspective of developmental gene expression in the Apicomplexa. Int J Parasitol 2009;39:145–51.
- Gissot M, Kim K. How epigenomics contributes to the understanding of gene regulation in Toxoplasma gondii. J Eukaryot Microbiol 2008;55:476–80.
- Vanagas L, Jeffers V, Bogado SS, Dalmasso MC, Sullivan WJ, Angel SO. Toxoplasma histone acetylation remodelers as novel drug targets. Expert Rev Anti Infect Ther 2012;10:1189–201.
- Fioravanti R, Mautone N, Rovere A, Rotili D, Mai A. Targeting histone acetylation/deacetylation in parasites: an update (2017–2020). Curr Opin Chem Biol 2020;57:65–74.
- Smith AT, Livingston MR, Mai A, Filetici P, Queener SF, Sullivan WJ. Quinoline derivative MC1626, a putative GCN5 histone acetyltransferase (HAT) inhibitor, exhibits HAT-independent activity against Toxoplasma gondii. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:1109–11.
- Jeffers V, Gao H, Checkley LA, Liu Y, Ferdig MT, Sullivan WJ. Garcinol Inhibits GCN5-Mediated Lysine Acetyltransferase Activity and Prevents Replication of the Parasite Toxoplasma gondii. Antimicrob Agents Chemother 2016;60:2164–70.
- Darkin-Rattray SJ, Gurnett AM, Myers RW, Dulski PM, Crumley TM, Allocco JJ, et al. Apicidin: a novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:13143–7.
- Strobl JS, Cassell M, Mitchell SM, Reilly CM, Lindsay DS. Scriptaid and suberoylanilide hydroxamic acid are histone deacetylase inhibitors with potent anti-Toxoplasma gondii activity in vitro. J Parasitol 2007;93:694–700.
- Bougdour A, Maubon D, Baldacci P, Ortet P, Bastien O, Bouillon A, et al. Drug inhibition of HDAC3 and epigenetic control of differentiation in Apicomplexa parasites. J Exp Med 2009;206:953–66.
- Loeuillet C, Touquet B, Oury B, Eddaikra N, Pons JL, Guichou JF, et al. Synthesis of aminophenylhydroxamate and aminobenzylhydroxamate derivatives and in vitro screening for antiparasitic and histone deacetylase inhibitory activity. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 2018;8:59–66.
- Araujo-Silva CA, De Souza W, Martins-Duarte ES, Vommaro RC. HDAC inhibitors Tubastatin A and SAHA affect parasite cell division and are potential anti-Toxoplasma gondii chemotherapeutics. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 2020;15:25–35.
- Sidik SM, Huet D, Ganesan SM, Huynh M-H, Wang T, Nasamu AS, et al. A Genome-wide CRISPR Screen in Toxoplasma Identifies Essential Apicomplexan Genes. Cell 2016;166:1423–35 e12.
- Bouchut A, Rotili D, Pierrot C, Valente S, Lafitte S, Schultz J, et al. Identification of novel quinazoline derivatives as potent antiplasmodial agents. Eur J Med Chem 2019;161:277–91.
- Kim D, Paggi JM, Park C, Bennett C, Salzberg SL. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. Nat Biotechnol 2019;37:907–15.
- Gajria B, Bahl A, Brestelli J, Dommer J, Fischer S, Gao X, et al. ToxoDB: an integrated Toxoplasma gondii database resource. Nucleic Acids Res 2008;36:D553–6.
- Gissot M, Kelly KA, Ajioka JW, Grealley JM, Kim K. Epigenomic Modifications Predict Active Promoters and Gene Structure in Toxoplasma gondii. PLoS Pathog 2007;3:e77 2007.
- Reynolds MG, Oh J, Roos DS. In Vitro Generation of Novel Pyrimethamine Resistance Mutations in the Toxoplasma gondii Dihydrofolate Reductase. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:1271–7.
- Saeij JPJ, Boyle JP, Grigg ME, Arrizabalaga G, Boothroyd JC. Bioluminescence imaging of Toxoplasma gondii infection in living mice reveals dramatic differences between strains. Infect Immun 2005;73:695–702.
- Di Pompo G, Salerno M, Rotili D, Valente S, Zwergel C, Avnet S, et al. Novel histone deacetylase inhibitors induce growth arrest, apoptosis, and differentiation in sarcoma cancer stem cells. J Med Chem 2015;58:4073–9.
- Ramakrishnan C, Maier S, Walker RA, Rehrauer H, Joekel DE, Winiger RR, et al. An experimental genetically attenuated live vaccine to prevent transmission of Toxoplasma gondii by cats. Sci Rep 2019;9:1474.
- Farhat DC, Swale C, Dard C, Cannella D, Ortet P, Barakat M, et al. A MORC-driven transcriptional switch controls Toxoplasma developmental trajectories and sexual commitment. Nat Microbiol 2020;5:570–83.
- Hakimi M-A, Deitsch KW. Epigenetics in Apicomplexa: control of gene expression during cell cycle progression, differentiation and antigenic variation. Curr Opin Microbiol 2007;10:357–62.
- Gissot M, Choi SW, Thompson RF, Grealley JM, Kim K. Toxoplasma gondii and Cryptosporidium parvum lack detectable DNA cytosine methylation. Eukaryot Cell 2008 Epub ahead of publication 4 January 2008.
- Farhat DC, Bowler M, Communie G, Pontier D, Belmudes L, Mas C, et al. A plant-like mechanism coupling m6A reading to polyadenylation safeguards transcriptome integrity and developmental genes partitioning in Toxoplasma. bioRxiv 2021. doi:10.1101/2021.02.23.432502.
- Holmes MJ, Padgett LR, Bastos MS, Sullivan WJ. m6A RNA methylation facilitates pre-mRNA 3'-end formation and is essential for viability of Toxoplasma gondii. bioRxiv 2021. doi:10.1101/2021.01.29.428772.
- Hammam E, Ananda G, Sinha A, Scheidig-Benatar C, Bohec M, Preiser PR, et al. Discovery of a new predominant cytosine DNA modification that is linked to gene expression in malaria parasites. Nucleic Acids Res 2020;48:184–99.
- Martynowicz J, Doggett JS, Sullivan WJ. Efficacy of Guanabenz Combination Therapy against Chronic Toxoplasmosis across Multiple Mouse Strains. Antimicrob Agents Chemother 2020;64.
- Doggett JS, Schultz T, Miller AJ, Bruzual I, Pou S, Winter R, et al. Orally Bioavailable Endochin-Like Quinolone Carbonate Ester Prodrug Reduces Toxoplasma gondii Brain Cysts. Antimicrob Agents Chemother 2020;64.
- Mouveaux T, Roger E, Gueye A, Eysert F, Huot L, Grenier-Boley B, et al. Primary brain cell infection by Toxoplasma gondii reveals the extent and dynamics of parasite differentiation and its impact on neuron biology. Open Biol 2021;11:210053.
- Ramakrishnan C, Walker RA, Eichenberger RM, Hehl AB, Smith NC. The merozoite-specific protein, TgGRA11B, identified as a component of the Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole in a tachyzoite expression model. Int J Parasitol 2017;47:597–600.
- Alvarez CA, Suvorova ES. Checkpoints of apicomplexan cell division identified in Toxoplasma gondii. PLoS Pathog 2017;13:e1006483.

5.3 Résultats complémentaires :

5.3.1 Identification de la ou des cibles de MC1742 :

5.3.1.1 Approche par étude structurale et bibliographique

L'objectif de cette étude est de tenter de déterminer la ou les cible/s potentielle/s du composé MC1742. La croissance des parasites *T. gondii* (notre étude) et *P. falciparum* (323) étant inhibée par ce composé, nous avons émis l'hypothèse qu'au moins une HDAC était structurellement proche entre ces deux parasites et que la cible de ce composé pourrait être cette dernière. Pour rappel, *T. gondii* présente 5 HDAC, et *P. falciparum* n'en possède que 3 HDAC.

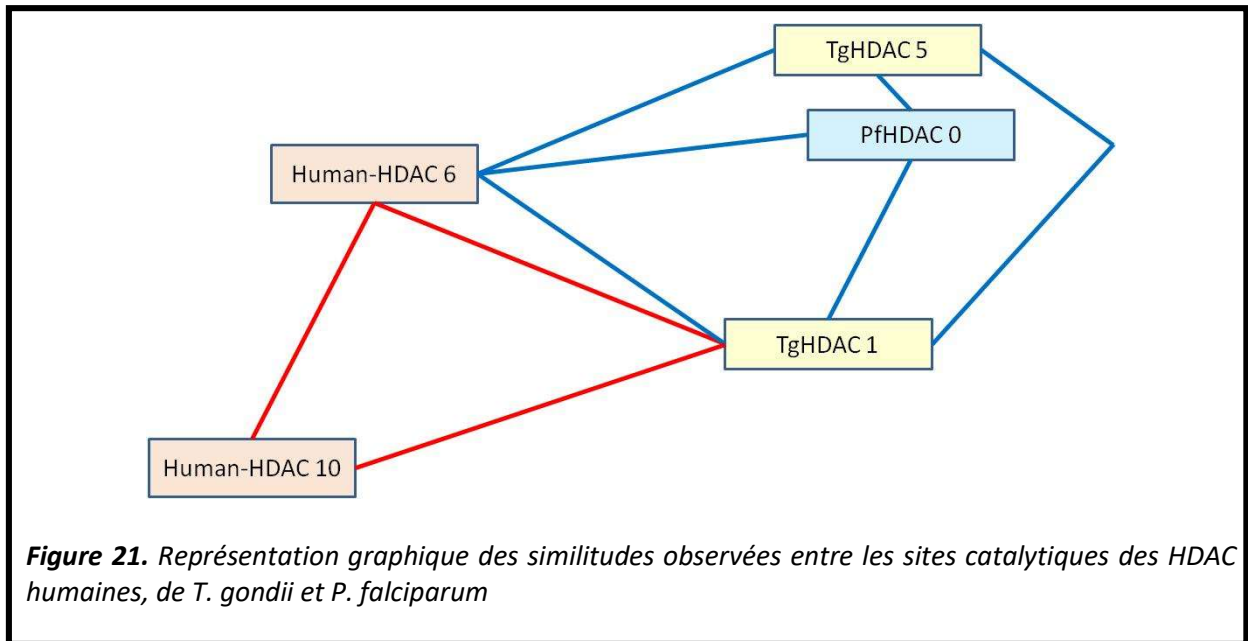
De plus, le composé MC1742 inhibe aussi les HDAC humaines et une étude a montré la spécificité relative de ce composé pour les HDAC 6, 3 et 10 (195) (Figure 20).

IC ₅₀ Values (μ M) of 1742 against the HDAC1-11 Isoforms humaines											
compd	IC ₅₀ vs HDAC (μ M)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0.10	0.11	0.02	>50	>50	0.007	>50	0.61	>50	0.04	0.1

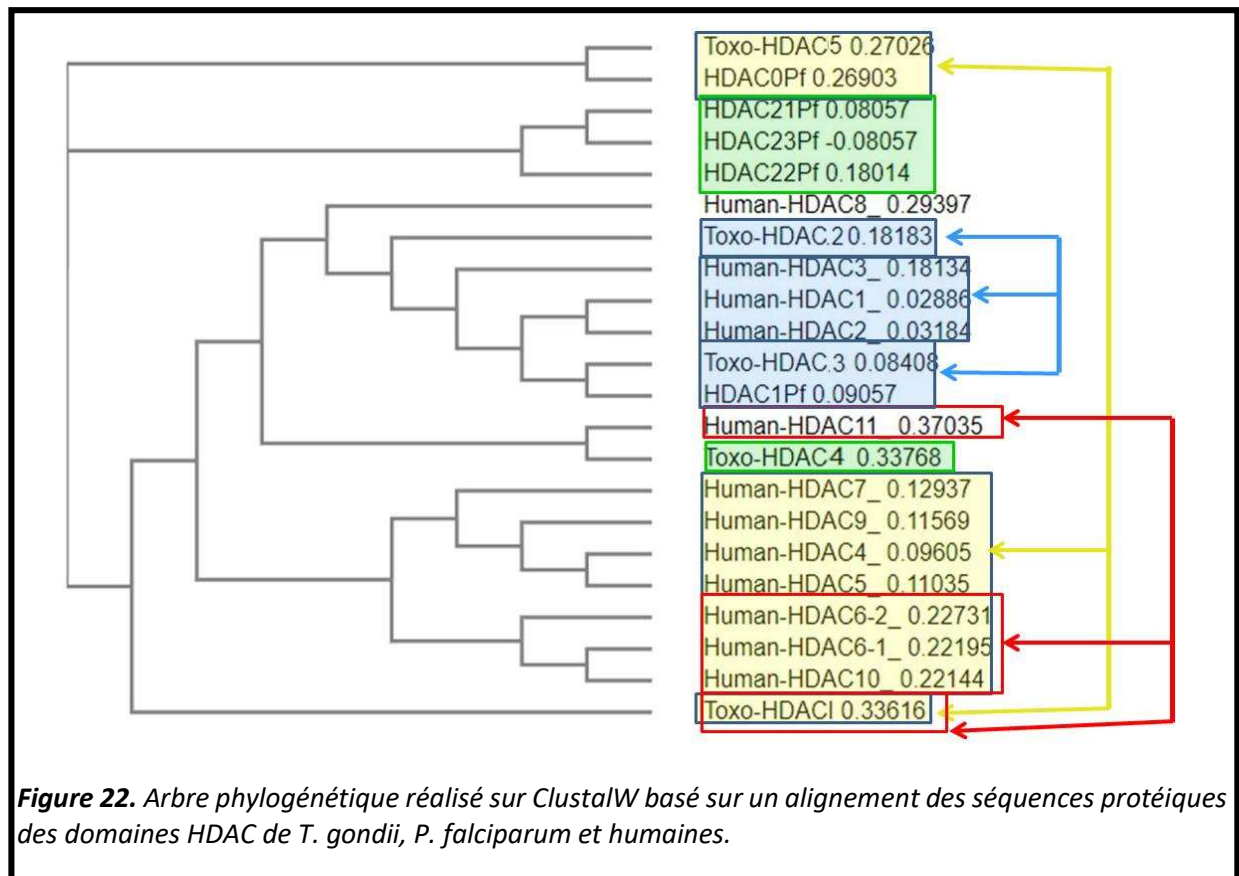
Figure 20. Représentation des IC50 de l'inhibiteur MC1742 sur chacune des 11 HDAC humaines

Nous pouvons également noter que MC1742 est efficace sur les HDAC humaines 1, 2 et 11. L'objectif est donc ici de savoir si certaines HDAC parasitaires ont un site catalytique présentant des similarités avec ceux des HDAC humaines 6, 3 et 10 afin d'orienter nos investigations vers les enzymes présentant la plus forte potentialité d'être ciblées par MC1742.

Une première analyse des séquences peptidiques des sites catalytiques des HDAC de *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* et humaines a été réalisée par le Dr Romier Christophe (Université de Strasbourg). Les observations réalisées montrent que l'HmHDAC6 et 10 présentent des propriétés communes avec TgHDAC1, TgHDAC5 et PfHDAC-0. TgHDAC5 est cependant la plus proche de PfHDAC0 et ces deux HDAC sont les plus divergentes de l'ensemble des autres HDAC. La séquence du site catalytique des HDAC parasitaires TgHDAC1, TgHDAC5 et PfHDAC0 semble donc être plus proche de celle des HDAC humaines 6 et 10 (figure 21) (flèches jaunes, figure 22).



Un alignement des séquences protéiques des domaines HDAC ainsi que la génération d'un arbre phylogénétique basé sur cet alignement a été réalisé sur ClustalW (Figure 22). Les observations précédemment obtenues ont été reportées sur cet arbre phylogénétique.



L'HDAC humaine 3 présente plus de similarité avec TgHDAC2, 3 et PfHDAC1 (Flèches bleues, figure22).

Selon l'analyse du Dr Romier, PfHDAC21, 22, 23 et TgHDAC4 sont trop courtes pour avoir un repliement de type HDAC (cadre vert, figure 22).

Il semble donc ressortir de cette étude de séquences que TgHDAC1 et 5 présentent une forte probabilité d'être ciblées par le composé MC 1742, mais également PfHDAC1, TgHDAC2 et TgHDAC3. De plus, chez Plasmodium, seul PfHDAC0 (qui est très proche de TgHDAC5) semble présenter des similitudes avec les HDAC humaines ciblées par le composé MC 1742.

Approche par modélisation tridimensionnelle

Les HDAC de *Toxoplasma gondii* ont été modélisées en 3 dimensions par le Pr-Dr Sippl Wolfgang (Université Martin Luther de Halle-Wittenberg) afin d'étudier l'interaction entre ces enzymes et le composé MC1742 in silico.

Une étude comparative des homologues par modélisation 3D entre HDAC de *T. gondii* et humaines a permis d'étayer les observations faites à travers l'étude « structurelle et bibliographique ».

Une grande similarité est observée entre TgHDAC5, HDAC6 et 10 humaines, TgHDAC1 et HDAC6 humaine, TgHDAC3 et HDAC1 humaine. Il apparaît une correspondance parfaite entre TgHDAC3 et HDAC1 humaine au niveau de la poche catalytique des HDAC (Tableau 5).

L'approche par modélisation tridimensionnelle renforce les premières observations issues de l'approche phylogénétique.

Modeling of *Toxoplasma gondii* HDACs.

TgHDAC (Uniprot ID)	Selected Template	With loops				Neglecting Loops				Suggested HDAC class
		Identity %		Similarity %		Identity %		Similarity %		
		All	Pocket	All	Pocket	All	Pocket	All	Pocket	
HDAC1 (S8F6L4)	5EEI (HDAC6)	27.7	83.3	39.0	88.9	31.6	83.3	44.5	88.9	Class IIa/b
HDAC2 (S8EP32)	6G3O (HDAC2)	46.5	87.5	61.6	87.5	47.7	100.0	62.7	100.0	Class I
HDAC3 (0A125YPH4)	5ICN (HDAC1)	64.4	100.0	80.6	100.0					Class I
HDAC4 (S8GBW3)										---
HDAC5 (S8GEI3)	5EEF (HDAC6/10)	25.7	68.8	40.4	75.0	28.3	68.8	44.1	75.0	Class IIb (CDII)

Tableau 5. Etude comparative entre HDAC du point de vue de l'identité et de la similarité de séquences peptidiques et modélisation tridimensionnelle sur les protéines entières et les sites catalytiques.

Approche par mutagenèse

Afin d'identifier l'HDAC ou les HDAC ciblée(s) par MC1742, la première stratégie réalisée avait pour but l'obtention de parasites résistants à l'inhibiteur. Nous avons donc réalisé une mutagenèse aléatoire dans les conditions identiques à celle réalisées lors de l'obtention de mutants résistants contre l'inhibiteur FR235222 (244). Nous avons ensuite sélectionné cette population de parasites mutés en

présence de l'inhibiteur d'intérêt. Malheureusement, aucune population résistante n'a émergé de la sélection.

Production de mutants inductibles pour les HDAC de *T. gondii*.

La deuxième stratégie que nous avons mis en place était l'obtention de mutants inductibles pour chacune des 5 HDAC du parasite. Les profils RNA-seq spécifiques à l'extinction de chaque HDAC seraient alors comparés à celui obtenu sur les parasites sauvages traités MC1742. Si le composé est spécifique d'un HDAC, alors nous devrions obtenir des profils similaires.

J'ai réalisé des constructions plasmidiques afin de générer des mutants exprimant chaque HDAC couplée à l'AID (Auxin Inductible Degrone) qui, en présence d'auxine, permet la dégradation de la protéine étiquetée. Cette stratégie a été privilégiée pour conserver la région promotrice et ne pas perturber la régulation fine de ces enzymes. Aucune des 5 constructions ne m'a permis d'obtenir des mutants stables. Nous avons émis l'hypothèse que l'étiquetage en C-terminal pourrait perturber l'activité enzymatique de ces protéines, ne permettant pas la sélection de ces mutants.

Pour pallier ce problème, une troisième stratégie d'extinction de gènes inductibles a été testée. Nous avons développé un nouvel outil permettant de placer la construction en position N-terminale grâce à l'insertion d'un « peptide de saut » (Skip-peptide) qui nous permet d'exprimer le gène de résistance (afin de sélectionner les parasites mutants) et la protéine cible sous le contrôle de son propre promoteur (figure 23).

Ce nouvel outil nous a permis de modifier l'expression d'autres protéines étudiées au sein du laboratoire, mais aucun parasite mutant n'a pu être généré par cette technique pour les HDAC du parasite. Il semble que toute perturbation du locus des HDAC de *T. gondii* soit fortement délétère pour la survie parasitaire.

Une dernière stratégie de remplacement des promoteurs de ces gènes par des promoteurs inductibles par la tétracycline a alors été mise en place. De nouveau, la transfection des constructions plasmidiques n'a pas permis l'obtention de mutants stables pour ces enzymes. L'hypothèse que nous formulons est qu'en remplaçant le promoteur des histones déacétylases, nous empêchons toute régulation induite par le promoteur endogène et perturbons ainsi grandement la régulation fine et dynamique des gènes du parasite.

Surexpression inductible des HDAC de *T. gondii*.

Un mutant codant pour une copie surnuméraire de TgHDAC5 a été généré. Cette surexpression est inductible grâce à l'utilisation du domaine DD (degradation domain) qui n'est stable qu'en présence de la molécule Shield-1. La surexpression de TgHDAC5 peut être modulée au sein de ce parasite par une concentration croissante en « Shield-1 ». La sensibilité de ce parasite au composé MC1742 a été étudiée en fonction de la quantité de TgHDAC5. Nous avons donc exposé des parasites sauvages et des parasites pouvant surexprimer TgHDAC5 à des concentrations variables de MC1742, et ceci en présence ou absence de « Shield-1 ». Nous avons ensuite mesuré le nombre de parasites moyen par vacuole comme mesure de la capacité du parasite à croître. Nous pouvons constater ici que la présence ou l'absence de « Shield-1 » n'impacte que très peu la croissance des parasites pour le mutant surexprimant TgHDAC-5 par rapport aux parasites sauvages (figure24), indiquant que la surexpression de la protéine TgHDAC5 n'est pas suffisante pour conférer une résistance à MC1742.

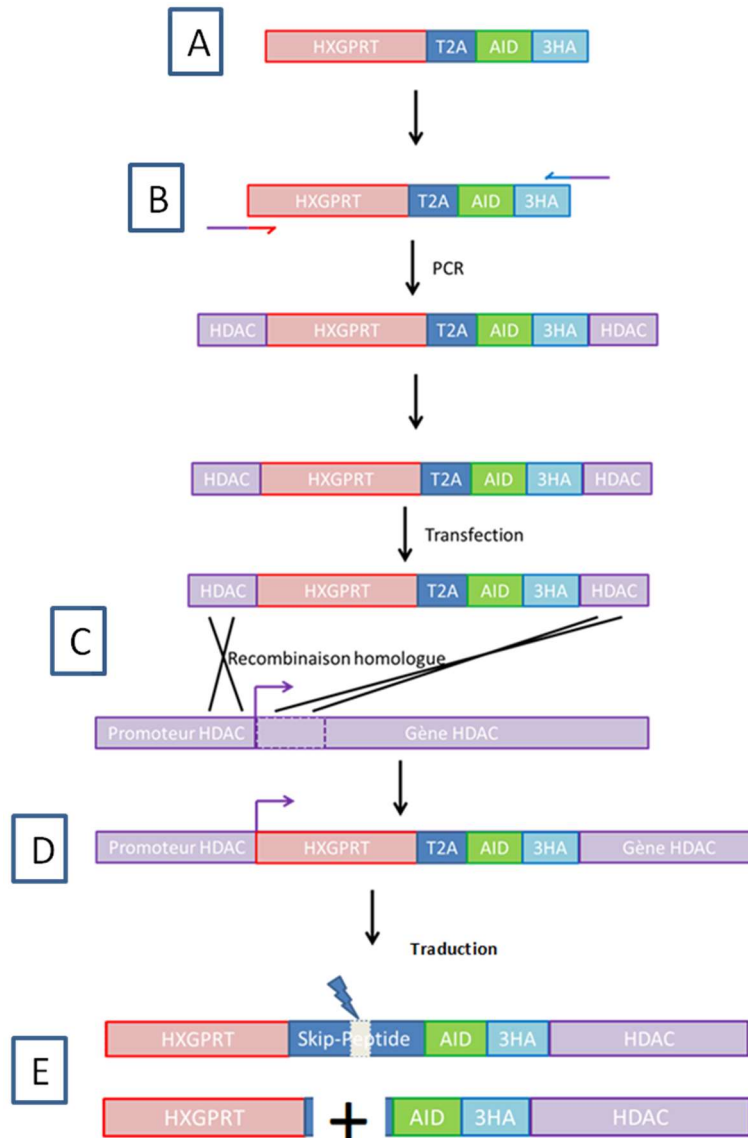
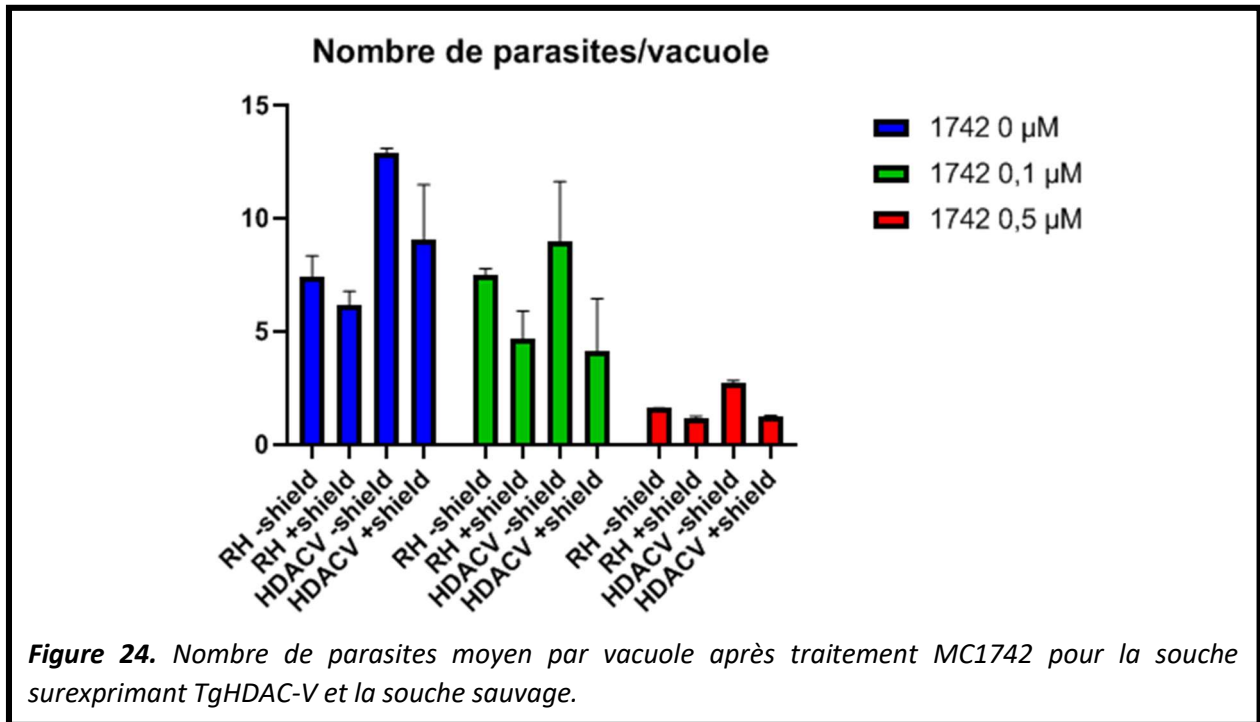


Figure 23. Construction AID en N-terminal

Dans le plasmide précédemment utilisé, nous avons inséré le gène de résistance HXGPRT (résistance à la xanthine et à l'acide mycophénolique) couplé au « peptide de saut » T2A, devant le site AID-3HA dans le même cadre de lecture (A). Ainsi, nous pouvons commander des séquences (« primers ») d'ADN homologues pour le début du gène HDAC et homologues pour la construction que nous avons réalisée (B). Le produit de PCR peut alors être transfecté dans le parasite afin de réaliser une double recombinaison avec l'ADN génomique et obtenir une insertion dans le début du gène HDAC ciblé (C). Sous contrôle du promoteur de l'HDAC ciblé, est maintenant exprimé un grand ARN codant pour la protéine de résistance fusionné par le T2A avec le reste de l'ARN codant pour la protéine HDAC avec l'AID en N-terminal (D). Durant la traduction, la protéine HxGPRT va être produite. Un saut peptidique sera effectué lors de la traduction du « Skip-peptide » aboutissant à la production d'une 2ème protéine AID-3HA-HDAC sous contrôle du même promoteur (E).

Au terme de l'ensemble de ces investigations, nous n'avons pas pu identifier la cible de MC1742 chez le parasite. Cependant, nos études RNA-seq, nous ont permis de démontrer que le traitement par ce composé induisait un profil d'expression très similaire à celui induit par l'inhibition spécifique de l'activité de la protéine TgHDAC3.



6 *Primary brain cell infection by Toxoplasma gondii reveals the extent and dynamics of parasite differentiation and its impact on neuron biology*

6.1 Introduction

La persistance du parasite dans l'organisme des hôtes infectés est assurée grâce à la formation de kystes latents dans certains tissus dont le cerveau. Les formes latentes ont la capacité d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Elles sont par ailleurs à l'origine des récurrences d'infections aux conséquences délétères sur la santé de l'hôte. La différenciation de tachyzoïte à bradyzoïte est donc un mécanisme crucial pour la persistance et la transmission du parasite. Cependant, les mécanismes biologiques à l'œuvre lors de cette différenciation et leur dynamique restent jusqu'alors peu explorés. En effet, le manque de modèles *in vitro* reproduisant toutes les étapes de ce processus a empêché l'accumulation des connaissances sur ces sujets. Les modèles actuels reposent sur l'induction de la différenciation par stress sur des parasites et les cellules hôtes. Cependant, ces techniques présentent de nombreuses limites quant à la maturité des kystes obtenus et l'aspect peu physiologique des conditions de culture.

Afin de répondre à cette problématique, nous avons créé un modèle *in vitro* reproduisant la différenciation spontanée des tachyzoïtes en bradyzoïtes en nous appuyant sur la conversion spontanée du parasite au sein de certains types cellulaires tels que les neurones et en sachant que la persistance des parasites au sein de ces cellules *in vivo* a déjà été décrites. Basés sur ces expériences, nous avons réalisé un modèle de culture *in vitro* de bradyzoïtes au sein de cellules cérébrales. Les études de conversions précédemment réalisées en culture de neurones se sont limitées à des inductions de courtes durées (4 jours maximum). Nous avons estimé qu'une culture *in vitro* de neurones nécessiterait le soutien d'autres cellules telles que les astrocytes, qui fournissent un soutien métabolique aux neurones et favorisent la fonction des synapses (324), prolongeant la survie des neurones durant plusieurs semaines. Par conséquent, nous avons infecté une culture de cellules cérébrales primaires complexes avec des tachyzoïtes de *T. gondii* pour étudier la dynamique de différenciation spontanée et la réponse de la cellule hôte à l'infection une fois les kystes établis. Nos observations démontrent une conversion spontanée du parasite dans ce modèle *in vitro* et un maintien des kystes ainsi obtenus durant une période minimale de 2 semaines. Nous avons mis en évidence les changements et leur dynamique dans l'expression des gènes du parasite et de la cellule cérébrale hôte durant la conversion tachyzoïte-bradyzoïte et chez le bradyzoïte mature par séquençage à haut débit. Nous avons montré que ce modèle produisait des kystes bradyzoïtes infectieux après 2 semaines de culture, reflétant ainsi les modèles *in vivo*. Ainsi, le modèle *in vitro* que nous avons établi offre une opportunité unique de disséquer les mécanismes moléculaires de la différenciation parasitaire et les conséquences de l'infection à *T. gondii* sur la biologie neuronale.

6.2 [Publication](#)

OPEN
BIOLOGY

royalsocietypublishing.org/journal/rsob

Research



Cite this article: Mouveaux T, Roger E, Gueye A, Eysert F, Huot L, Grenier-Boley B, Lambert J-C, Gissot M. 2021 Primary brain cell infection by *Toxoplasma gondii* reveals the extent and dynamics of parasite differentiation and its impact on neuron biology. *Open Biol.* **11**: 210053.

<https://doi.org/10.1098/rsob.210053>

Received: 9 March 2021

Accepted: 12 August 2021

Subject Area:

microbiology/neuroscience/cellular biology

Keywords:

brain cell, *Toxoplasma gondii*, neuron, differentiation, bradyzoites, parasite

Author for correspondence:

Mathieu Gissot

e-mail: mathieu.gissot@pasteur-lille.fr

Electronic supplementary material is available online at <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.5628924>.

THE ROYAL SOCIETY
PUBLISHING

Primary brain cell infection by *Toxoplasma gondii* reveals the extent and dynamics of parasite differentiation and its impact on neuron biology

Thomas Mouveaux¹, Emmanuel Roger¹, Alioune Gueye¹, Fanny Eysert², Ludovic Huot¹, Benjamin Grenier-Boley², Jean-Charles Lambert² and Mathieu Gissot¹

¹U1019—UMR 9017—CILL—Center for Infection and Immunity of Lille, University of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France

²U1167, University of Lille, Inserm, Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France

ER, 0000-0002-0982-0369; J-CL, 0000-0003-0829-7817; MG, 0000-0003-0047-8189

Toxoplasma gondii is a eukaryotic parasite that forms latent cysts in the brain of immunocompetent individuals. The latent parasite infection of the immune-privileged central nervous system is linked to most complications. With no drug currently available to eliminate the latent cysts in the brain of infected hosts, the consequences of neurons' long-term infection are unknown. It has long been known that *T. gondii* specifically differentiates into a latent form (bradyzoite) in neurons, but how the infected neuron responds to the infection remains to be elucidated. We have established a new *in vitro* model resulting in the production of mature bradyzoite cysts in brain cells. Using dual, host and parasite RNA-seq, we characterized the dynamics of differentiation of the parasite, revealing the involvement of key pathways in this process. Moreover, we identified how the infected brain cells responded to the parasite infection revealing the drastic changes that take place. We showed that neuronal-specific pathways are strongly affected, with synapse signalling being particularly affected, especially glutamatergic synapse signalling. The establishment of this new *in vitro* model allows investigating both the dynamics of parasite differentiation and the specific response of neurons to long-term infection by this parasite.

1. Introduction

Toxoplasma gondii is a unicellular eukaryotic pathogen. It belongs to the Apicomplexa phylum, which encompasses some of the deadliest pathogens of medical and veterinary importance, including *Plasmodium* (the cause of malaria), *Cryptosporidium* (responsible for cryptosporidiosis) and *Eimeria* (causative agent of coccidiosis). *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite. Although toxoplasmosis is generally asymptomatic, it can lead to the development of focal central nervous system (CNS) infections in immunocompromised hosts. In addition, *Toxoplasma* is also a clinically important opportunistic pathogen that can cause birth defects in the offspring of newly infected mothers. The worldwide seroprevalence of *T. gondii* infection is estimated to be between 30% and 70% in humans, although it differs significantly depending on geographical areas [1].

The life cycle of *T. gondii* is complex, with multiple differentiation steps that are critical to parasite survival in human and feline hosts [2]. Infection by oocysts containing sporozoites shed by cats or by bradyzoites contaminating ingested meat leads to differentiation into rapidly growing tachyzoites that are responsible for clinical manifestations in humans. The conversion of the tachyzoites into

© 2021 The Authors. Published by the Royal Society under the terms of the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>, which permits unrestricted use, provided the original author and source are credited.

bradyzoites, responsible for the acute or the chronic phase of the disease, respectively, is made possible by the unique ability of the tachyzoite to spontaneously differentiate into the bradyzoite form in specific cell types such as muscle cells or neurons. These latent bradyzoites are thought to persist in the infected host for prolonged periods due to their ability to evade the immune system and to resist commonly used drug treatments. Bradyzoites have also the ability to reactivate into virulent tachyzoites and cause encephalitis, in particular in immunocompromised hosts [3]. Therefore, tachyzoite to bradyzoite interconversion is a critical step for the pathogenesis and survival of the parasite. *Toxoplasma gondii* tachyzoite to bradyzoite stress-induced differentiation has been extensively studied *in vitro* using alkaline stress and other stimuli [4]. However, this process does not produce persisting cysts that express mature bradyzoite markers [5]. It merely reflects the complexity of the process observed *in vivo*. For example, much higher rates of spontaneous differentiation are observed in primary neurons [6]. However, the infection of primary neurons was only performed for short periods (up to 4 days) [7–10]. Therefore, a global understanding of the kinetics and dynamics of differentiation is lacking due to widespread use of the imperfect, but easy to handle, stress-induced differentiation model.

Toxoplasma gondii latent infection of the immune-privileged CNS is linked to most complications that can be fatal in the case of reactivation of bradyzoite cysts in immune-deficient hosts. These intracellular parasites migrate to the brain and cross the blood–brain barrier (BBB) by a Trojan horse mechanism [11] or by compromising the permeability of the BBB after infection and lysis of epithelial cells [12]. After reaching the CNS, the parasites can invade all nucleated cells, although infection is detected and persist in neurons *in vivo* [13]. Consistent with the ability of this parasite to infect and persist in neurons, *T. gondii* has been linked to behavioural changes in rodent models. The most prevalent study reported the ability of the parasite to specifically manipulate the behaviour of rodents in relation to predator–prey interactions. In these studies, chronically infected mice were specifically impaired for their aversion to feline urine scent [14,15]. Moreover, *T. gondii* infection has been directly implicated in modulating dopamine production [16], decreasing levels of norepinephrine and glutamate [17,18], altering GABAergic signalling [19], thereby inducing an imbalance in neuronal activity [20], inducing neuron apoptosis [21] and altering synaptic protein composition [22]. Chronic toxoplasmosis is also correlated with the establishment of low-grade neuroinflammation characterized by the production of proinflammatory cytokine interferon-gamma (IFN- γ). IFN- γ is critical to control parasite replication [23] by inducing cell-autonomous immunity of immune resident brain cells notably astrocytes and microglia. Recently, *T. gondii*-induced neuroinflammation has also been linked to behavioural changes in rodents [24,25], indicating that infection probably causes direct and indirect effects on neuronal functions. In humans, a growing number of studies have linked *T. gondii* to psychiatric diseases such as schizophrenia [26,27], behaviour alterations [28], and neurodegenerative diseases such as Parkinson and Alzheimer disease [29], although the causality is not direct and the effect of *T. gondii* infection on human behaviour is likely to be subtle [30]. Indeed, chronic neuroinflammation may

also cause neurological disorders by producing neurodegeneration or neurotransmitter abnormalities and therefore altering the neuron functionality [31]. *Toxoplasma gondii* infection may therefore have lifelong effects on the CNS of immunocompetent hosts.

Although global measurement of alteration at the whole-brain level [32,33] clearly indicates broad changes in neuron biological functions, the extent of the modifications of the individual neuron during long-term infection is not understood. Similarly, *in vivo* studies could not address the kinetics of the spontaneous differentiation of the parasite. To address this question, we reasoned that an *in vitro* culture of neurons would require the support of other cells such as astrocytes, which provide metabolic support for neurons and promote the function of synapses [34]. Therefore, we infected a complex primary brain cell culture with *T. gondii* tachyzoites to study the spontaneous differentiation dynamics and the host cell response to infection during differentiation and once the cysts are established. We show here that spontaneous differentiation occurs using this *in vitro* system and can be maintained for at least 14 days. Using RNA-seq, we characterized the dynamic changes in both parasite and host cell gene expression. We investigated the kinetics of parasite differentiation and the alteration of the brain cell gene expression after infection. We showed that this model produced infective bradyzoite cysts after two weeks of culture, mirroring *in vivo* models. Thus, the *in vitro* model we established offers a unique opportunity to dissect the molecular mechanisms of parasite differentiation and the consequences of *T. gondii* infection on neuron biology.

2. Material and methods

2.1. Parasite strains and culture

Toxoplasma gondii tachyzoites of the 76 K strain were propagated *in vitro* in human foreskin fibroblasts (HFF) using Dulbecco's modified Eagles medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine and 1% penicillin-streptomycin. Tachyzoites were grown in ventilated tissue culture flasks at 37°C and 5% CO₂. Prior to infection, intracellular parasites were purified by sequential syringe passage with 17-gauge and 26-gauge needles and filtration through a 3 μ m polycarbonate membrane filter (Whatman)

2.2. Brain cell culture

Primary neuronal cultures were obtained from the hippocampus of postnatal (P0) rats as described previously [35]. Briefly, after the dissection of the brains, hippocampi were washed three times in HBSS (HBSS, 1-M HEPES, penicillin-streptomycin, and 100 mM sodium pyruvate, Gibco) and were dissociated via trypsin digestion (2.5%, 37°C, Gibco) for 7 min. Next, hippocampi were incubated with DNase (5 mg ml⁻¹, Sigma) for 1 min and washed again in MEM medium supplemented with 10% SVE, 1% Glutamax, 0.8% MEM vitamins, 0.5% penicillin-streptomycin and 0.45% d-glucose (Sigma). With a pipette, hippocampi were mechanically dissociated and resuspended in Neurobasal A, a medium supplemented with GlutaMAX and B27 neural supplement with antioxidants (Gibco). Cells were resuspended in culture medium, counted and plated at a density

of 100 000 cells cm^{-2} 24-well plates. Plates were pre-coated with 0.1 mg ml^{-1} poly-L-lysine in 0.1 M borate buffer (0.31% boric acid, 0.475% sodium tetraborate, pH=8.5; Sigma) overnight at 37°C and rinsed thoroughly with water. In total, 200 000 brain cells were seeded per well in 24-well plates. Brain cells were maintained at 37°C in a humidified 5% CO_2 incubator. Brain cells were grown for 14 days before infection.

2.3. Brain cell culture infection

Tachyzoites of the 76 K strain were collected from an infected HFF T25 flask and purified by sequential syringe passage with 17-gauge and 26-gauge needles and filtration through a 3 μm polycarbonate membrane filter (Whatman). Brain cells that were grown and matured in Neurobasal A medium for 14 days were infected by the parasite. For that, the correct amount of tachyzoites was resuspended in 50 μl of Neurobasal A medium and then added onto the brain cell culture. Approximately 2×10^5 brain cells were present in a well of a 24-well plate. Each well was infected by 3×10^4 tachyzoites to a multiplicity of infection of one parasite for around seven cells. The infected culture was maintained at 37°C in a humidified 5% CO_2 incubator for the duration of the experiment without adding media to avoid disturbing the brain cell culture. A typical experiment yielded 2.5×10^4 cysts per well of a 24-well plate (around 12.5% of the 2×10^5 brain cells).

2.4. Mouse infection

Animal housing and experimentation were carried out in accordance with the French Council in Animal Care guidelines for the care and use of animals and following the protocols approved by the Institut Pasteur de Lille's ethical committee (no. 11082-2017072816548341 v2). Brain cells were infected as described above for a duration of 7 or 14 days. Infected and uninfected cells from a single well of a 24-well plate were scraped from the plates and resuspended in 400 μl of sterile PBS. Mice were gavaged with 200 μl of the solution containing the resuspended cells. The content of a single well of a 24-well plate was used to gavage two mice. Uninfected brain cell culture samples were collected at the same time as the 14-day-infected cells. Four weeks after gavage, brains were collected and homogenized individually. Cysts were counted after *Dolichol biflorus* lectin labelling of the cyst wall for 30 min at room temperature to a dilution of 1:400 in PBS. One-fifth of the brain of each mouse was scored for the presence of lectin-positive cysts.

2.5. RNA sample collection and library preparation

RNA samples were collected after infecting the primary brain cell cultures by the 76 K strain for 24 h, 48 h, 96 h, 7 days and 14 days. Uninfected brain cell culture samples were collected at the same time as the 24 h infected cells time point. Infected and uninfected cells were washed with 1 ml of PBS (two times) and lysed by a direct load of Trizol in the plate. RNA was extracted as per manufacturer instruction and genomic DNA was removed using the RNase-free DNase I Amplification Grade Kit (Sigma). All RNA samples were assessed for quality using an Agilent 2100 Bioanalyzer.

RNA samples with an integrity score greater than or equal to 8 were included in the RNA library preparation. Triplicates (biological replicates) were produced for each condition. The TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit (Illumina) was used to prepare the RNA libraries according to the manufacturer's protocol. Library validation was carried out by using DNA high-sensitivity chips passed on an Agilent 2100 Bioanalyzer. Library quantification was carried out by quantitative PCR (12 K QuantStudio).

2.6. RNA-seq and analysis

Clusters were generated on a flow cell within a cBot using the Cluster Generation Kit (Illumina). Libraries were sequenced as 50 bp-reads on a HiSeq 2500 using the sequence by synthesis technique (Illumina). HiSeq control software and real-time analysis component were used for image analysis. Illumina's conversion software (bcl2fastq 2.17) was used for demultiplexing. Datasets were aligned with HiSAT2 v. 2.1.0 [36] against the *T. gondii* ME49 genome from (ToxoDB-39) [37] and against the rat genome (*Rattus norvegicus* Rn6 (UCSC)). Expression for annotated genes was quantified using htseq-count and differential expression was measured by DESeq2. *P*-values for multiple testing were adjusted using the Benjamini-Hochberg method. Differentially expressed genes (DEG) with adjusted *p*-values below 0.05 and \log_2 fold changes (FCs) above 2 were considered in this study. Gene ontology was performed using the PANTHER [38] (Version 15) Overrepresentation Test (Released 20190711) surveying GO Slim Biological pathways using the Fisher statistical test for significance. RNA-seq data that support the findings of this study have been deposited in the GEO database under the accession no. GSE168465.

2.7. Immunofluorescence analysis

Infected and uninfected brain cell cultures were fixed using 4% PFA for 30 min. The coverslips were incubated with primary antibodies and then secondary antibodies coupled to Alexa-Fluor-488 or Alexa-Fluor-594. Primary antibodies used for IFAs include anti-TgE_{no}2, anti-TgSAG1, anti-MAP2 and anti-GFAP and were used at the following dilutions 1:1000, 1:1000, 1:500 and 1:500, respectively. A lectin from *Dolichos biflorus* coupled to fluorescein was also used at 1:400 dilution to identify the parasitic vacuoles. Confocal imaging was performed with a ZEISS LSM880 Confocal Microscope. All images were processed using Carl Zeiss ZEN software. Quantification of immunofluorescence assays was carried out manually by counting the concerned signal by visual observation. The signal corresponding to at least 100 vacuoles was counted for each replicate.

2.8. Western blot

Total protein extracts representing infected or uninfected cells were resuspended in 1X SDS buffer. The protein samples were then fractionated on a 10% SDS-polyacrylamide electrophoresis gel and then transferred onto a nitrocellulose membrane. The anti-VGLUT1 (cat no. 48-2400, Thermo-Fischer) and anti-GAPDH antibodies were used at a 1:1000 dilution. Chemiluminescent detection of bands was carried out by using Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate.

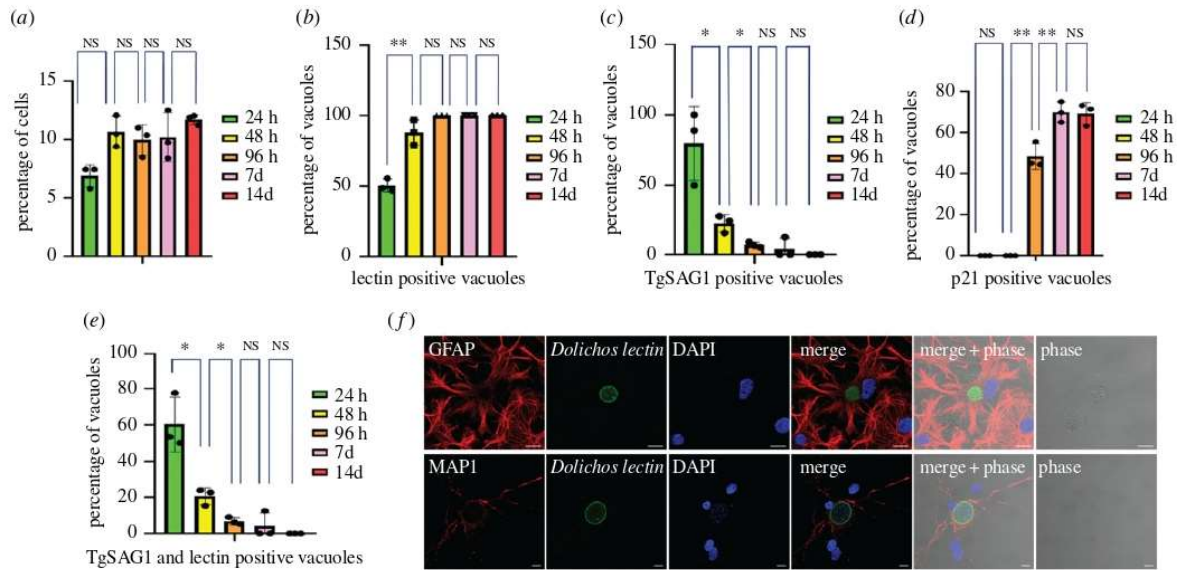


Figure 1. Critical aspects of the primary brain cell culture and its infection by *T. gondii*. (a) Graphical representation of the number of infected cells in the brain primary cell culture. Bar graph representing the percentage of infected cells over time after 24 h (green), 48 h (yellow), 96 h (orange), 7 days (pink) and 14 days (red) of infection. A Student's *t*-test was performed; two-tailed *p*-value; NS: $p > 0,05$; mean \pm s.d. ($n = 3$, independent experiments). (b) Graphical representation of the number of *D. bifluorus* lectin-positive vacuoles. Bar graph representing the percentage of infected cells over time after 24 h (green), 48 h (yellow), 96 h (orange), 7 days (pink) and 14 days (red) of infection. A Student's *t*-test was performed; two-tailed *p*-value; **: $p < 0,01$; NS: $p > 0,05$; mean \pm s.d. ($n = 3$, independent experiments). (c) Graphical representation of the number of vacuoles expressing the tachyzoite marker TgSAG1. Bar graph representing the percentage of TgSAG1 positive parasite vacuoles over time after 24 h (green), 48 h (yellow), 96 h (orange), 7 days (pink), and 14 days (red) of infection. A Student's *t*-test was performed; two-tailed *p*-value; *: $p < 0,05$; NS: $p > 0,05$; mean \pm s.d. ($n = 3$, independent experiments). (d) Graphical representation of the number of vacuoles expressing the late bradyzoite marker p21. Bar graph representing the percentage of p21 positive parasite vacuoles over time after 24 h (green), 48 h (yellow), 96 h (orange), 7 days (pink) and 14 days (red) of infection. A Student's *t*-test was performed; two-tailed *p*-value; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; NS: $p > 0,05$; mean \pm s.d. ($n = 3$, independent experiments). (e) Graphical representation of the number of vacuoles expressing both the tachyzoite marker TgSAG1 and presenting a lectin labelling. Bar graph representing the percentage of parasite vacuoles double-positive for TgSAG1 and *D. bifluorus* lectin labelling over time after 24 h (green), 48 h (yellow), 96 h (orange), 7 days (pink) and 14 days (red) of infection. A Student's *t*-test was performed; two-tailed *p*-value; *: $p < 0,05$; NS: $p > 0,05$; mean \pm s.d. ($n = 3$, independent experiments). (f) Immunofluorescence labelling of bradyzoite cysts in astrocytes and neurons 7 days post-infection. Confocal imaging demonstrating the presence of bradyzoite cysts (green, labelled with the *D. bifluorus* lectin) in astrocytes (upper panel, red, labelled with GFAP) or neurons (lower panel, red, labelled with MAP2). Anti-GFAP and anti-MAP2 were used as astrocyte and neuron markers, respectively. The scale bar (10 μ m) is indicated on the lower right side of each confocal image.

3. Results

3.1. Establishment of the *in vitro* infection model of primary brain cell culture

To produce the primary brain cell culture, we extracted brain cells from newborn rats and placed them in culture for 14 days before infection. By immunofluorescence and after quantification, we determined that neurons represented at least 30% of the cells present in culture as identified by the MAP2 marker (electronic supplementary material, figure S1A). Astrocytes, as identified by the GFAP marker, represent more than 50% of the total cells while glial cells and oligodendrocytes represented around 20% of all the cells (electronic supplementary material, figure S1A). This percentage did not vary over time (electronic supplementary material, figure S1A) or after infection (electronic supplementary material, figure S1B). Infection occurred and persisted in neurons and astrocytes and was maintained over time with a similar percentage of cells being infected until the 14 days time point (figure 1a). To characterize the *T. gondii* spontaneous differentiation dynamics in this *in vitro* model, we followed the expression of tachyzoite (TgSAG1) and bradyzoite (Cyst wall labelled by *Dolichos bifluorus* lectin and p21, a late bradyzoite

marker [39]) markers over time. Spontaneous differentiation occurred within a short time frame in the brain cells with the appearance of parasites expressing a marker of the cyst wall (labelled by the *D. bifluorus* lectin) 24 h after infection representing more than 90% of the parasite population after 96 h (figure 1b). Parasites expressing the tachyzoite marker TgSAG1 followed a reverse trend (figure 1c). We noted the appearance of the late bradyzoite marker (p21) in cysts 96 h after infection and more than 70% of the cyst population was positive for this marker after 7 days (figure 1d). Interestingly, we observed transitioning parasites until 48 h of infection (expressing both tachyzoite and bradyzoite markers TgSAG1 and *D. bifluorus* lectin; figure 1e), while all the parasites expressing p21 were also positive for the *D. bifluorus* lectin (electronic supplementary material, figure S1C). Imaging of parasites at 7 days after infection demonstrates that the parasites converted to bradyzoites and established latency in both astrocytes and neurons in this *in vitro* model (figure 1f).

3.2. Dual RNA-seq on the parasite and host cell during the spontaneous parasite differentiation

To assess the transcriptome changes during the parasite spontaneous differentiation and the host response to infection, we

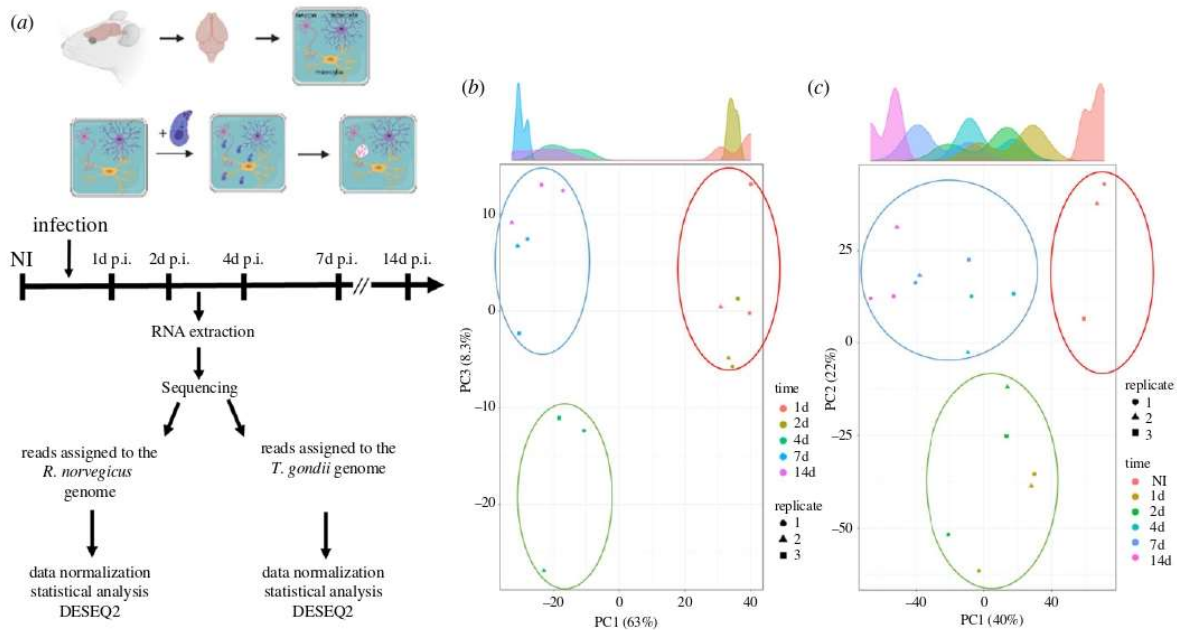


Figure 2. Dual RNA-seq on the uninfected and *T. gondii*-infected primary brain cell culture. (a) Schematic of the experiment representing the main steps of the primary brain cell culture and the time points when RNA was extracted. Libraries were created and processed through high-throughput sequencing. Reads were assigned to either the *R. norvegicus* or *T. gondii* genome and DEGs were assigned using DESEQ2. (b) PCA of the *T. gondii* triplicate results for each time point. Each replicate is represented by a square, a triangle and a circle. Each time point was assigned a colour: orange (1d), brown(2d), dark green (4d), dark blue (7d) and pink (14d). Based on this analysis, three main groupings were found and represented by a circle: red circle (1d and 2d), green circle (4d) and blue circle (7d and 14d), suggesting sharp transition during differentiation. (c) PCA of the *R. norvegicus* triplicate results for each time point. Each replicate is represented by a square, a triangle and a circle. Each time point was assigned a colour: orange (non-infected, NI), brown (1d), green (2d), light blue (4d), dark blue (7d) and pink (14d). Based on this analysis, three main groupings were found and represented by a circle: red circle (non-infected, NI), green circle (1d and 2d) and blue circle (4d, 7d and 14d).

collected triplicate RNA samples of infected primary CNS cell culture at 1, 2, 4, 7 and 14 days post-infection (figure 2a). We analysed transcriptomic profiles of both the parasite and host cells (electronic supplementary material, figure S2A and S2B). Sequencing reads were assigned to the rat or the parasite genome (table 1). For each time point, the infected host transcriptome was compared to a non-infected host cell culture. Reads assigned to the parasite genome were compared to purified tachyzoite-derived sequencing reads. We used a *p*-value cut-off of 0,05 and a minimum twofold change to identify DEG using the DESEQ2 program (table 2; electronic supplementary material, table S1 and S2). We performed a principal component analysis (PCA) to identify how each condition was clustering (figure 2b,c). On the parasite side, the PCA analysis revealed that expression was similar between the time points 1d and 2d, while 4d appeared to represent the transition from the tachyzoite to the bradyzoite-specific expression observed at day 7d and 14d (figure 2b). On the host side, PCA showed that the response to infection was different for the 1d and 2d time points compared to 7d and 14d (figure 2c).

3.3. Spontaneous parasite differentiation transition is reflected by specific expression patterns

We compared the parasite expression profiles obtained for each time point of the brain cell infected culture (figure 3a). Differential expression mirrors the timing of spontaneous differentiation. Indeed, most of the changes are initiated at 1d and 2d p.i. and are maintained during later time points

(figure 3a, 636 DEG). At these time points, parasites are still transitioning (figure 3a and table 2; electronic supplementary material, table S1). A turning point is observed at 4d post-infection when the late bradyzoite markers are detected in the *in vitro* culture (figure 1), and parasites further differentiate to mature bradyzoites at days 7 and 14 (figure 3a, 1200 DEG common to 4d, 7d and 14d). Little changes are identified in the parasite transcriptome between day 7 and day 14 (figure 3a; electronic supplementary material, table S1). The list of common DEGs between each time point encompasses the main bradyzoite markers such as BAG1, ENO1, LDH2 and BRP1 (table 3). By contrast, tachyzoite markers (LDH1, ENO2 and SAG1) were repressed with a different dynamic (table 3). While SAG1 is already repressed 1d after infection, ENO2 and LDH1 were significantly repressed only after 4d of infection (table 3). We performed pathway-enrichment analyses based on the 1200 common DEGs for the 4d, 7d and 14d time points and found that classical pathways known to be repressed such as translation are overrepresented (electronic supplementary material, figure S3). Similarly, the GO-enriched pathways based on the upregulated genes are in line with the carbohydrate metabolism switch known to happen during differentiation (electronic supplementary material, figure S3) [40].

3.4. Parasites established in brain cell culture may represent bradyzoites

Expression profiles during stress-induced differentiation were already characterized in numerous studies [41–43]. We

Table 1. Number of reads assigned to the *R. Norvegicus* or *T. gondii* genes.

time point (days)	infection	number of reads assigned to the rat genes	% rat	number of reads assigned to the <i>T. gondii</i> genes	% <i>T. gondii</i>	number total of reads
1	infected	25 252 078	90.73	2 579 227	9.27	27 831 305
1	infected	22 971 803	94.27	1 397 078	5.73	24 368 881
1	infected	25 176 593	96.21	990 451	3.79	26 167 044
2	infected	17 660 544	64.35	9 783 780	35.65	27 444 324
2	infected	19 808 387	79.82	5 007 576	20.18	24 815 963
2	infected	20 621 012	80.37	5 036 121	19.63	25 657 133
4	infected	18 187 041	64.73	10 456 789	35.27	28 643 830
4	infected	17 572 568	74.21	6 106 382	25.79	23 678 950
4	infected	22 141 916	80.89	5 232 408	19.11	27 374 324
7	infected	17 699 964	64.02	9 949 129	35.98	27 649 093
7	infected	16 120 663	68.96	7 257 703	31.04	23 378 366
7	infected	21 899 771	85.98	3 569 992	14.02	25 469 763
14	infected	23 960 501	84.48	4 401 325	15.52	2 836 1826
14	infected	23 324 543	90.36	2 488 854	9.64	25 813 397
14	infected	23 134 477	91.05	2 273 878	8.95	25 408 355
	non-infected	924 580	99.99	3214	0.01	927 794
	non-infected	337 050	99.99	3148	0.01	340 198
	non-infected	160 965	99.99	1398	0.01	162 363
	tachyzoites	1452	0.01	8 825 308	99.99	8 826 760
	tachyzoites	1215	0.01	8 085 704	99.99	8 086 919
	tachyzoites	966	0.01	8 687 601	99.99	8 688 567

Table 2. Number of identified DEGs for *R. norvegicus* and *T. gondii*.

comparison	identified genes				total cut-off >2
	DESeq2	DEG	up	down	
<i>R. norvegicus</i>					
1d versus NI	12 936	4642	1066	1523	2589
2d versus NI	12 978	3362	1050	1184	2234
4d versus NI	12 960	3114	837	784	1621
7d versus NI	12 985	3995	1150	1232	2382
14d versus NI	13 055	4907	1434	1690	3124
<i>T. gondii</i>					
1d versus tachyzoites	7212	2203	610	305	915
2d versus tachyzoites	7381	3241	842	416	1258
4d versus tachyzoites	7745	4634	1220	1005	2225
7d versus tachyzoites	7768	5002	1843	1224	3067
14d versus tachyzoites	7697	4459	1749	1035	2784

compared the expression profiles of up- and downregulated genes after alkaline stress-induced differentiation with the brain cell infected culture RNA-seq results. To account for experimental design and strain differences, we gathered a list of DEGs after alkaline stress-induced differentiation that was common to these three experiments [41–43]. We also compared our dataset to the DEGs that were identified after RNA-seq on *in vivo*-derived bradyzoites [40]. Since there is a clear phenotypic switch between the early time points (1d and 2d) of the infected brain cell culture and the late time points (4d, 7d and 14d), we extracted the DEGs that were common to either early time points (1d and 2d) or late time points (4d, 7d and 14d). This comparison was carried out for upregulated DEGs (figure 3b,c) and downregulated DEGs (electronic supplementary material, figure S4A and S4B). At early time points, the number of shared upregulated DEGs is equivalent between our dataset and the alkaline stress-induced differentiation or *in vivo*-derived bradyzoites (figure 3b). By contrast, at the late time points, the brain cell infected culture DEGs are closer to the *in vivo*-derived bradyzoites DEGs than the alkaline stress-induced differentiation DEGs (figure 3c). Similar results were obtained for the downregulated genes (electronic supplementary material, figure S4A and S4B). This indicates that these late time point brain cell-produced bradyzoites may better represent the slow maturation of bradyzoites that is observed *in vivo*. However, brain cell-derived, *in vivo*-derived and stress-induced bradyzoites appear to be three distinct populations with regard

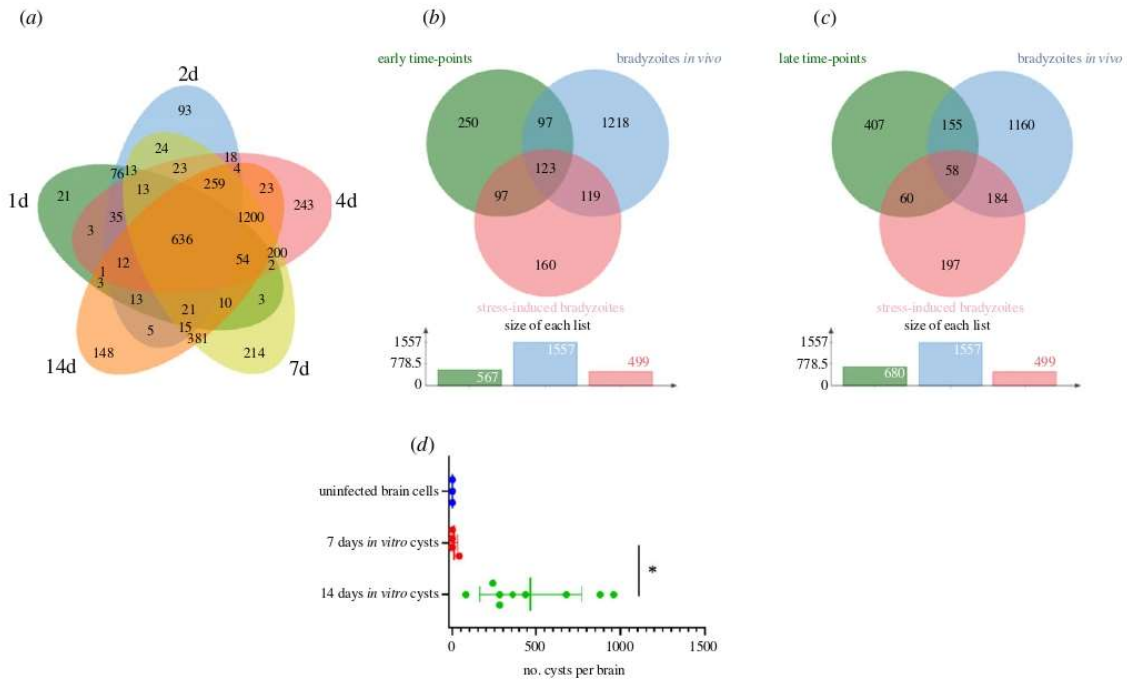


Figure 3. Bradyzoites produced in the infected primary brain cell culture are comparable to *in vitro* and *in vivo* produced bradyzoites. (a) Venn diagram of the identified DEGs when comparing tachyzoite to parasite expressed genes at each time point of the brain cell culture. DEGs for the 1d time point are grouped in a green circle. DEGs for the 2d time point are grouped in a blue circle. DEGs for the 4d time point are grouped in a red circle. DEGs for the 7d time point are grouped in a yellow circle. DEGs for the 14d time point are grouped in an orange circle. Several unique or shared DEGs are indicated. (b) Venn diagram of the identified upregulated DEGs common for the 1d and 2d time points (green circle), the stress-induced upregulated DEGs (red circle) and the *in vivo*-derived bradyzoites upregulated DEGs (blue circle). The number of unique or shared DEGs is indicated. At the bottom, the size of each list of DEGs is indicated. (c) Venn diagram of the identified upregulated DEGs common for the 4d, 7d and 14d time points (green circle), the stress-induced upregulated DEGs (red circle) and the *in vivo*-derived bradyzoites upregulated DEGs (blue circle). The number of unique or shared DEGs is indicated. At the bottom, the size of each list of DEGs is indicated. (d) Bradyzoites cysts produced *in vitro* using the primary brain cell culture can transmit the infection after oral gavage. Mice were gavaged by uninfected (blue), 7 days (red) and 14 days (green) infected brain cells. After 6 weeks, mouse brains were collected and the number of cysts per brain was measured. A Student's *t*-test was performed; two-tailed *p*-value; *: $p < 0,05$; mean \pm s.d.

Table 3. Gene expression for tachyzoite and bradyzoite markers. Log₂ FC comparing the expression of *T. gondii* transcripts at each time point of the infected brain cell culture to that of purified tachyzoites. Colour gradient depends on the value of FC. Downregulated values are represented by shades of green. Upregulated values are represented in shades of red. For each transcript, the gene identification number (gene ID) and the corresponding annotation are also presented.

Gene ID	Annotation	1d	2d	4d	7d	14d
TGME49_268860	ENO1	5,48	7,34	10,00	10,50	10,17
TGME49_291040	LDH2	7,49	8,71	9,87	10,55	10,26
TGME49_259020	BAG1	6,65	8,76	9,64	10,29	10,28
TGME49_314250	BRP1	3,71	4,84	3,47	4,05	4,33
TGME49_233460	SAG1	-1,91	-2,37	-4,65	-7,29	-6,48
TGME49_268850	ENO2	-0,46	-0,39	-1,72	-3,53	-3,15
TGME49_232350	LDH1	-0,53	-0,65	-1,54	-2,04	-1,78

to DEGs. Overall, brain cell-derived bradyzoites do not match the *in vivo* bradyzoite profile better than stressed induced-derived bradyzoites.

We investigated if the bradyzoite cysts produced *in vitro* using brain cells could be able to infect mice after oral gavage. In this experiment, the cysts have to go through the digestive system and release the bradyzoites in the gut of the mouse to proceed to the infection of intestine cells. The parasites will then turn into tachyzoites and eventually produce cysts in the brains. We used the cysts formed *in vitro*

after 7 or 14 days of differentiation and uninfected brain cells to gavage mice. Six weeks after gavage, we collected the brains of the infected mice and probed for the presence of cysts. All the mice that were gavaged using 14 days *in vitro* cysts were successfully infected and presented cysts in their brain, while only one mouse presented cysts when using 7 days *in vitro* cysts (figure 3d) indicating that 14-day cysts may have gone through more maturation steps. No cysts were found in the mice infected by brain cells alone (figure 3d).

Table 4. Gene expression for known tachyzoite effectors. Log₂ FC comparing the expression of *T. gondii* transcripts at each time point of the infected brain cell culture to that of purified tachyzoites. Colour gradient depends on the value of FC. Downregulated values are represented in shades of green. For each transcript, the gene identification number (gene ID) and the corresponding annotation are also presented.

Gene ID	Annotation	1d	2d	4d	7d	14d
TGME49_308090	ROP5	-2,53	-2,67	-4,48	-3,37	-3,25
TGME49_205250	ROP18	-0,97	-0,97	-2,85	-2,28	-2,31
TGME49_258580	ROP17	-0,85	-0,66	-2,66	-2,47	-2,00
TGME49_262730	ROP16	-0,34	-0,47	-3,28	-3,66	-3,58
TGME49_275470	GRA15	-0,81	-0,75	-4,71	-5,33	-4,00
TGME49_208830	GRA16	-2,00	-1,61	-4,00	-4,75	-4,52
TGME49_230180	GRA24	-1,26	-2,11	-2,01	-3,30	-3,26
TGME49_240060	TgIST	0,46	0,49	0,59	0,71	0,54

3.5. Expression patterns during parasite differentiation suggest an overhaul of invasion and host cell remodelling activities in the bradyzoite

Tachyzoites have a distinctive ability to modulate the expression of host cells by injecting parasite proteins to hijack the host's regulatory pathways [44]. Very limited information is available about the expression of exported proteins from bradyzoites [45,46] and their abilities to manipulate the host cells. We examined the expression of effector proteins that are known to be exported to the host cell cytosol and nucleus [44]. In our dataset, we found that most of the known effectors were downregulated during differentiation indicating that their expression is no longer needed for bradyzoite development (table 4). Notably, TgIST was the only effector that presented a similar expression level in tachyzoites and bradyzoites and this was for all the time points examined (table 4). As shown before for tachyzoite and bradyzoite markers (table 3), day 4 represented a breaking point where the bradyzoite expression program replaces that of the tachyzoite. Exploring the expression of other potential effectors suggested that a complete transformation in the expression of these proteins is taking place during differentiation (electronic supplementary material, table S3). We also investigated the expression of proteins specialized in the invasion of host cells to verify if the bradyzoites also adapted their invasion machinery. Surprisingly, most of the proteins known to be important for tachyzoite invasion were downregulated (table 5). Instead, a specialized subset of genes (RON2L1, RON2L2, sporoAMA1, AMA2 and AMA4 to a lesser extent) were over-expressed in bradyzoites especially at later time points. These proteins could potentially functionally replace in bradyzoites the tachyzoite specific AMA1 and RON2 proteins (table 5). However, as shown previously in *in vivo*-derived bradyzoites datasets [40], the reads' coverage for sporoAMA1 is only partial in the late time points (14d) indicating that this gene probably produces truncated transcripts and proteins at that stage (electronic supplementary material, figure S5A). By contrast, the AMA2 gene seems to produce full-length transcripts that are preferentially expressed in the late time points of the brain cell infected culture (electronic supplementary material, figure S5B). In line with these profound changes, the expression pattern of ApiAP2 transcription factors that may be responsible for the establishment of the specific expression profile varied also

during differentiation (electronic supplementary material, figure S6). ApiAP2 expression profiles grouped in different clusters (electronic supplementary material, figure S6A): a first bradyzoite cluster induced early during differentiation that contained AP2IX-9 [47], a second bradyzoite cluster with factors induced later during differentiation containing AP2XI-4 [48] and a tachyzoite specific cluster with AP2IX-5 [49] and AP2XI-5 and AP2X-5 [50]. PCA based on the ApiAP2 expression profiles mirrored the transition during differentiation (electronic supplementary material, figure S6B). ApiAP2 transcription factors that may control different processes during differentiation may be present in the bradyzoite cluster.

3.6. Brain cell culture showed a differential response to tachyzoite and bradyzoite infection

On the host side, infection by *T. gondii* tachyzoites triggered a strong response of the host cells (table 2; electronic supplementary material, table S2). This response is mostly stable during the 14d of infection since a large number of DEGs are common between each time point (834 DEGs, figure 4a,b). However, the early response at 1d (with 521 unique DEGs) and 2d (318 DEGs only present at day 1 and 2 p.i.) may be specific to acute infection (figure 4a). We also noted that the later time points (7d and 14d p.i.) presented a unique differential expression pattern (531 DEGs specific from 14d and 433 only common to 7d and 14d). This indicates that a distinctive host response to tachyzoite infection (early time points) is induced when compared to the time when cysts are established (7 and 14 days p.i.). We separated DEGs between upregulated (electronic supplementary material, figure S7A) and downregulated (electronic supplementary material, figure S7B), and we identified similar trends with a number of DEGs being shared between each time point and representing the common response to infection. We also noted that a subset of DEGs was upregulated or downregulated at the first time points while a specific response was also emerging for later time points.

3.7. Upregulation of immune-related pathways is a hallmark of *Toxoplasma gondii*-infected brain cell culture

We performed a pathway-enrichment analysis on the rat genes that are differentially expressed when comparing the brain cell

Table 5. Gene expression for transcripts encoding proteins known to be involved in invasion. Log₂ FC comparing the expression *T. gondii* transcripts at each time point of the infected brain cell culture to that of purified tachyzoites. Colour gradient depends on the value of FC. Downregulated values are represented in shades of green. Upregulated values are represented in shades of red. Transcripts that were not detected are indicated by a double dash (-). For each transcript, the gene identification number (gene ID) and the corresponding annotation are also presented.

Gene ID	Annotation	1d	2d	4d	7d	14d
TGME49_255260	AMA1	-1,20	-1,45	-1,47	-1,25	-1,38
TGME49_294330	AMA4	-1,35	-0,58	0,31	0,05	0,52
TGME49_300130	AMA2	0,89	0,90	4,29	4,56	4,41
TGME49_315730	sporoAMA1	--	--	8,60	9,51	9,37
TGME49_265120	sporoRON2 - RON2L2	3,52	4,00	6,40	6,38	6,67
TGME49_294400	RON2L1	0,82	1,35	0,80	0,90	0,97
TGME49_310010	RON1	-0,51	-0,44	-1,59	-0,97	-0,92
TGME49_300100	RON2	-0,88	-0,83	-2,59	-2,29	-1,84
TGME49_223920	RON3	-0,53	-0,44	-2,26	-2,52	-2,08
TGME49_229010	RON4	-0,77	-0,88	-2,48	-2,27	-1,62
TGME49_311470	RON5	-1,04	-1,11	-2,29	-1,85	-1,47
TGME49_297960	RON6	-0,86	-0,87	-2,27	-1,92	-1,74
TGME49_306060	RON8	-0,69	-0,74	-2,27	-2,35	-1,90
TGME49_308810	RON9	-0,39	-0,33	-0,82	-0,80	-0,60
TGME49_261750	RON10	-0,98	-0,99	-1,09	0,00	-0,07

uninfected cultures to the infected cultures at different time points (figures 4b and 5a). First, we looked into upregulated genes that were common for all time points and identified that the main response was an immune response to the infection that lasted during the 14 days of infection (figure 4b). In particular, the response to chemokine (GO:1990868) and the chemokine-mediated signalling pathway (GO:0070098) was overrepresented (figure 4a). Similarly, upregulated DEGs belonging to the cellular response to cytokine stimulus (GO:0071345) and response to cytokine (GO:0034097) pathways were also overrepresented. Moreover, the response to interleukin-1 (GO:0070555) was also enriched in this dataset. This is in line with the neuroinflammation observed *in vivo* [51] and probably reflects the activation of astrocytes and glial cells present in the culture. This indicates that both microglia and astrocytes present in the brain cell culture responded strongly to the infection *in vitro*. Moreover, a specific response is observed in early time points (days 1 and 2), with a clear enrichment of genes involved in cell cycle and DNA replication arrest (GO:0045839 and GO:0051985) indicating that infection may induce an arrest of cell division of the brain cells such as glial cells (electronic supplementary material, figure S8A). At later time points, further activation of microglia may take place with the CD80 expression along with Galactin9 expression (electronic supplementary material, figure S8B).

3.8. *Toxoplasma gondii* infection induces downregulation of key neuron functions and pathways

Downregulated DEGs common to all time points were analysed using gene ontology. The synapse function was impacted at all time points (figure 5a). Notably, the most enriched pathways downregulated were linked to synapse plasticity and transmission (GO:0050804, GO:0007269 and GO:0007268). In particular, the glutamatergic synapse was affected with the

downregulation of metabotropic glutamate receptors (Grm1, 2 and 4) and glutamate ionotropic receptor (Grik1, NMDA2C and 2D) as previously described *in vivo* [18]. At later time points, the downregulation of a supplementary metabotropic glutamate receptor (Grm8) together with Homer 1 and 2 protein homologues that link the glutamate receptor to downstream signalling, indicated potential long-term impairment of the glutamate receptor signalling pathway (GO:0007215). We inspected the expression of the Grm1 protein during the infection of brain cells and confirmed the downregulation of this protein illustrating the long-term effects of *T. gondii* infection on the glutamatergic synapse (figure 5b; electronic supplementary material, figure S8C). Similarly, the glutamate decarboxylase isoforms (Gad1 and Gad2), responsible for GABA production in neurons, were downregulated since 1d recapitulating what was observed *in vivo* [19]. The synaptic signalling was also globally impacted with the downregulation of numerous membrane trafficking regulatory transcripts such as Synaptotagmin-1, Synapsin-2 or Otoferlin.

At early time points (1d and 2d), a specific response to infection consisted of the downregulation of axonemal dynein complex assembly (GO:0070286) pathway that suggested an arrest of axonemal assembly. At the same time points, the generation of the action potential and therefore excitability of neurons may be impacted by the downregulation of the potassium ion transmembrane transport (GO:0071805) pathway that may occur in neurons or astrocytes. The expression of both the regulatory membrane potential (GO:0042391) and chemical synaptic transmission (GO:0007268) pathways was also further decreased at late time points of infection, suggesting a strong impact on neuron function.

4. Discussion

Tachyzoite to bradyzoite differentiation is a key aspect of *T. gondii* biology and pathogenesis. To date, it has been

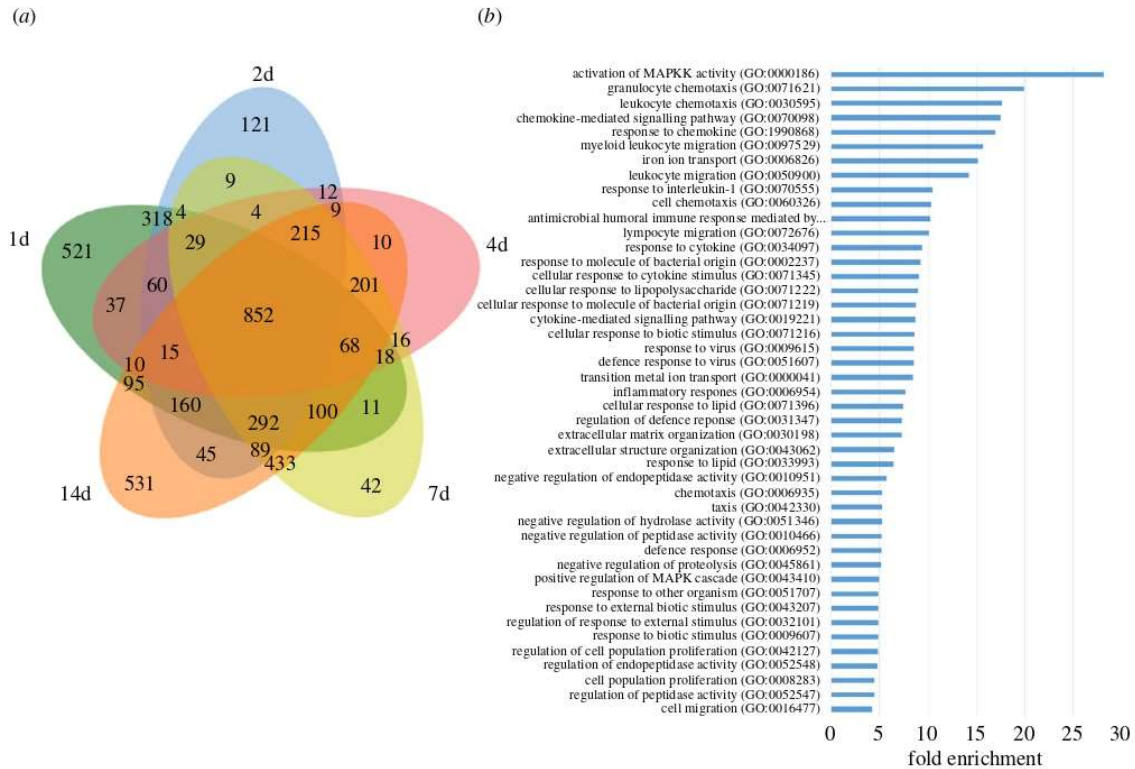


Figure 4. Analysis of identified *R. norvegicus* DEG in the infected primary brain cell culture when compared to uninfected samples. (a) Venn diagram of the identified DEGs for each time point. DEGs for the 1d time point are grouped in a green circle. DEGs for the 2d time point are grouped in a blue circle. DEGs for the 4d time point are grouped in a red circle. DEGs for the 7d time point are grouped in a yellow circle. DEGs for the 14d time point are grouped in an orange circle. The number of unique or shared DEGs is indicated. The total number of DEGs for each time point is indicated at the bottom of the figure. (b) Enriched GO pathways for upregulated DEGs that are shared for all time point infected brain cells. Pathways were selected with an FDR of 0.05 and a minimum enrichment of 4. The name of each GO pathway is indicated on the left part of the figure. Bars represent the enrichment fold.

mainly tackled through the use of an *in vitro* model of stress-induced differentiation that merely reflected the process of spontaneous differentiation observed *in vivo*. Moreover, little is known on the consequences of the long-term infection of targeted host cells *in vivo* (mainly neuron and muscle cells). To better assess the spontaneous differentiation process and the host cell response to infection, we established a complex *in vitro* model where parasites are in contact with multiple cell types normally present in the brain. We reasoned that this complex environment will permit a sustainable long-term infection model. We were able to produce a viable environment promoting neuron survival for a minimum time of 28 days. Using this composite *in vitro* culture system, we successfully established and maintained the infection of neurons and astrocytes by the parasite that progressively express mature bradyzoite markers for at least 14 days. Primary neuronal infection by tachyzoites and bradyzoite differentiation was already experimented in different models for short time frames (up to 4 days) [7–10]. We were able to produce cysts in neurons that could be kept in culture for at least 14 days although longer time frames could be achieved (30 days, data not shown). Strikingly, the cysts produced using this new *in vitro* system have all the molecular features of mature cysts previously observed *in vivo*. They are also infective by oral gavage demonstrating that some of the cysts in the brain cell culture present an intact cyst wall and these *in vitro* produced bradyzoites can readily infect the

mouse intestine. Surprisingly, bradyzoites were found in both neurons and astrocytes, a feature that is found in rat, mouse and human primary brain cell culture [6,9,52] but not in mouse brains where bradyzoite survival is only sustained in neurons [13]. Immune cells, that are absent in the primary brain cell culture, may be crucial to eliminate the infected astrocytes *in vivo*.

We showed that parasite expression of bradyzoite markers appeared early in the differentiation process suggesting that the parasites are switching expression patterns at the beginning of the infection process. We observed parasites that were able to co-express markers of both tachyzoite and bradyzoite forms. This illustrates that differentiation is a dynamic process during which tachyzoites expressing bradyzoite markers can be observed until 4 days into the transition. RNA-seq also demonstrated that tachyzoite marker expression is only significantly repressed after 4 days. Such co-expression has also been observed during differentiation *in vivo* [53]. After 7 days, the expression profiles revealed by RNA-seq suggest that the parasites present in the brain cell culture have mainly switch to a bradyzoite-specific expression program. We did not observe major differences in gene expression between 7 and 14 days of culture (electronic supplementary material, table S1). However, only the 14-day bradyzoites containing cysts were competent for mouse infection through gavage, indicating that a maturation process, which is not reflected by transcriptional changes, is

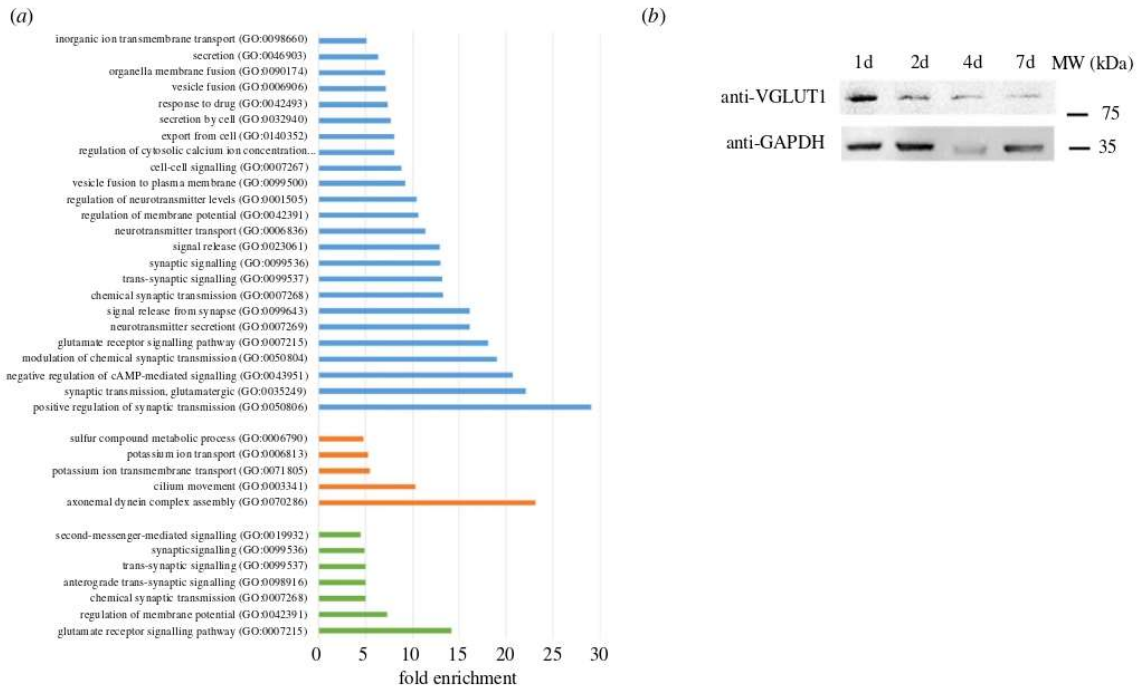


Figure 5. Gene ontology analysis of enriched downregulated pathways in brain cells. (a) Enriched GO pathways for downregulated DEGs that are shared for all time point infected brain cells (blue bars), shared for 1d and 2d time points (orange bars) and shared for 7d and 14d time points (green bars). Pathways were selected with an FDR of 0.05 and a minimum enrichment of 4. The name of each GO pathway is indicated on the left part of the figure. Bars represent the enrichment fold. (b) Western blot showing the expression of Grm1 (VGLUT1) in neurons after 1, 2, 4 and 7 days of infection. GAPDH is used as a loading control.

still undergoing after 7 days. This post-transcriptional maturation process may involve the modification of the cyst wall.

The parasites produced after 14 days of *in vitro* culture are therefore infectious by oral gavage. In this proof of principle experiment, we showed that using half of a single well of 24-well plate of brain cell-derived bradyzoites is sufficient to produce cysts *in vivo* after oral gavage. However, more work is needed to establish how many brain cell-derived cysts are sufficient to infect a mouse. The *in vitro* culture model described here may be a way to reduce experimental mouse usage. The simplicity to produce the starting material (1 well of a 24-well plate can be used to infect two mice) also offers the possibility to test the infectiousness by oral gavage of multiple parasite mutants. Interestingly, similar results were obtained using a human myotube-based *in vitro* culture model [54], indicating that *in vitro* production of infectious cysts is also possible in other cell types for which a tropism exists *in vivo*.

By examining the expression pattern of transitioning parasites, we observed that the expression of ApiAP2 transcription factors was differentially regulated. Two clusters that appeared early and late during differentiation were identified and may coordinate the dynamic expression profiles observed in the brain cell culture. Interestingly, the over-expression of BFD1, the master switch of differentiation [42], was only observed from 4 days onwards, although its expression might be regulated through a post-transcriptional mechanism. This indicates that multiple layers of regulation may be essential to produce mature bradyzoites.

We have also identified that the expression of the major tachyzoite effectors of host cell manipulation was repressed during differentiation except for TgIST. This suggests that the bradyzoites express a new set of proteins to enable their persistence in neurons. It would be interesting to characterize

the proteins that are specifically expressed during differentiation and that have the potential to be exported in the host cell. We also observed the same phenomenon for proteins known to be involved in invasion. Invasion proteins such as AMA1 and RON2, which are key to form a tight connection between the invading parasite and host cell membranes, may be replaced in the bradyzoites by AMA2 or AMA4 and RON2L1 or RON2L2. This modification may be necessary for the bradyzoites to invade specific host cells, such as enterocytes, to complete the life cycle. These new findings are critical for understanding the fundamental changes that occur after differentiation. It suggests that bradyzoites remodel their parasite-host interaction machinery to adapt to a narrower host cell range (intestine enterocyte, neurons and muscle cells) compared to tachyzoites.

Neurons are strongly impacted by *T. gondii* infection. We found that both GABA and glutamate signalling were disrupted in the brain cell culture much like what has been observed *in vivo* in *T. gondii*-infected mouse brains. The glutamate signalling is disrupted from the beginning of the infection with the downregulation of both metabotropic glutamate receptors and glutamate ionotropic receptors. The latter was shown to be repressed in mouse-infected brains [55] and participate in a process proposed to contribute to the establishment of psychiatric disorders such as schizophrenia although the effect of *T. gondii* infection on human behaviour is likely subtle [30]. Thus, this study extends the number of receptors that may be downregulated during infection and further emphasize the impact of infection and inflammation on glutamate signalling.

We also discovered that early on in infection, axonemal growth might be repressed. Development, as well as allowing maintenance of correct cilia structure, is essential for the

unique neuron sensory properties, suggesting that neurons may respond to infection by limiting their ability to transfer information. Repression of membrane trafficking regulatory mechanisms was also observed suggesting that the synapse function may be disrupted. This may be aggravated when the parasite established a long-term infection since both membrane potential and chemical synaptic transmission are further disturbed at later time points of the infection. Our data expand and confirm the extent of neuronal function disruption during *T. gondii* infection.

Toxoplasma gondii infection has been linked to a change in behaviour in rodents [14,15]. The strong disruption of glutamate and GABA signalling previously reported [19] is confirmed by our study and may provide a link between the behaviour changes and the infection by *T. gondii*. Since we also observed a signature of a strong neuroinflammation as was shown *in vivo*, it is difficult to define the contribution of the direct infection of neurons and the indirect effects of neuroinflammation on the neuronal pathways. Recent data [24,25] indicate the importance of neuroinflammation in *T. gondii*-induced behavioural changes.

We have established that parasites spontaneously differentiate when infecting a primary brain cell culture. Differentiated parasites present the hallmarks of bradyzoites and persist in culture for prolonged periods. Therefore, this *in vitro* system provides a unique opportunity to dissect the dynamic features of parasite differentiation, but also the

direct effect of infection on neuron biology. It could also be of interest for the screening of novel molecules that may be able to eliminate the parasite cyst once it is established in the neurons.

Ethics. Animal housing and experimentation were carried out in accordance with the French Council in Animal Care guidelines for the care and use of animals and following the protocols approved by the Institut Pasteur de Lille's ethical committee (no. 11082-2017072816548341 v2).

Data accessibility. RNA-seq data that support the findings of this study have been deposited in the GEO database under the accession no. GSE168465.

Authors' contributions. T.M. was involved in data collection, data analysis and interpretation; E.R. was involved in critical revision of the article and drafting the manuscript; A.G. was involved in data collection; F.E. was involved in data collection; L.H. was involved in data collection; B.G.-B. was involved in data analysis and interpretation; J.-C.L. was involved in conception or design of the work and drafting the manuscript; M.G. was involved in conception or design of the work, drafting the manuscript, data analysis and interpretation.

Competing interests. We declare we have no competing interests.

Funding. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), and the CPER CTRL Longévité (to M.G. and J.C.L.).

Acknowledgements. The authors wish to thank the BioImaging Center Lille for access to instruments and Dr Marion and Asma S. Khelifa for critically reading the manuscript.

References

- Montoya JG, Liesenfeld O. 2004 Toxoplasmosis. *Lancet Lond. Engl.* **363**, 1965–1976. (doi:10.1016/S0140-6736(04)16412-X)
- Kim K, Weiss LM. 2004 *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int. J. Parasitol.* **34**, 423–432. (doi:10.1016/j.ijpara.2003.12.009)
- Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. 2011 Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol. Rev.* **240**, 269–285. (doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00992.x)
- Jeffers V, Tampaki Z, Kim K, Sullivan WJ. 2018 A latent ability to persist: differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 2355–2373. (doi:10.1007/s00018-018-2808-x)
- Soete M, Fortier B, Camus D, Dubremetz JF. 1993 *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. *Exp. Parasitol.* **76**, 259–264. (doi:10.1006/expr.1993.1031)
- Halonen SK, Lyman WD, Chiu FC. 1996 Growth and development of *Toxoplasma gondii* in human neurons and astrocytes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**, 1150–1156. (doi:10.1097/00005072-199611000-00006)
- Bando H, Lee Y, Sakaguchi N, Pradipta A, Sakamoto R, Tanaka S, Ma JS, Sasai M, Yamamoto M. 2019 *Toxoplasma* effector GRA15-dependent suppression of ifn- γ -induced antiparasitic response in human neurons. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 140. (doi:10.3389/fcimb.2019.00140)
- Swierzy U, Händel U, Kaever A, Jarek M, Scharfe M, Schlüter D, Lüder CG. 2017 Divergent co-transcriptomes of different host cells infected with *Toxoplasma gondii* reveal cell type-specific host-parasite interactions. *Sci. Rep.* **7**, 7229. (doi:10.1038/s41598-017-07838-w)
- Lüder CGK, Giraldo-Velásquez M, Sendtner M, Gross U. 1999 *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. *Exp. Parasitol.* **93**, 23–32. (doi:10.1006/expr.1999.4421)
- Creuzet C, Robert F, Roisin MP, Van Tan H, Benes C, Dupouy-Camet J, Fagard R. 1997 Neurons in primary culture are less efficiently infected by *Toxoplasma gondii* than glial cells. *Parasitol. Res.* **84**, 25–30. (doi:10.1007/s004360050351)
- Harker KS, Ueno N, Lodoen MB. 2015 *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. *Parasit. Immunol.* **37**, 141–149. (doi:10.1111/pim.12163)
- Konradt C *et al.* 2016 Endothelial cells are a replicative niche for entry of *Toxoplasma gondii* to the central nervous system. *Nat. Microbiol.* **1**, 16001. (doi:10.1038/nmicrobiol.2016.1)
- Gabral CM, Tuladhar S, Dietrich HK, Nguyen E, Macdonald WR, Trivedi T, Devineni A, Koshy AA. 2016 Neurons are the primary target cell for the brain-tropic intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* **12**, e1005447. (doi:10.1371/journal.ppat.1005447)
- Vyas A, Kim SK, Giacomini N, Boothroyd JC, Sapolsky RM. 2007 Behavioral changes induced by toxoplasma infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 6442–6447. (doi:10.1073/pnas.0608310104)
- Abdulai-Saiku S, Vyas A. 2017 Loss of predator aversion in female rats after *Toxoplasma gondii* infection is not dependent on ovarian steroids. *Brain. Behav. Immun.* **65**, 95–98. (doi:10.1016/j.bbi.2017.04.005)
- Martin HL, Alsaady I, Howell G, Prandovszky E, Peers C, Robinson P, Mcconkey GA. 2015 Effect of parasitic infection on dopamine biosynthesis in dopaminergic cells. *Neuroscience* **306**, 50–62. (doi:10.1016/j.neuroscience.2015.08.005)
- Alsaady I *et al.* 2019 Downregulation of the central noradrenergic system by *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* **87**, e00789-18. (doi:10.1128/IAI.00789-18)
- David CN *et al.* 2016 GLT-1-dependent disruption of CNS glutamate homeostasis and neuronal function by the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* **12**, e1005643. (doi:10.1371/journal.ppat.1005643)
- Brooks JM, Carrillo GL, Su J, Lindsay DS, Fox MA, Blader U. 2015 *Toxoplasma gondii* infections alter GABAergic synapses and signaling in the central nervous system. *mBio* **6**, e01428-15. (doi:10.1128/mBio.01428-15)

20. Tyejbi S, Seizova S, Gamham AL, Hannan AJ, Tonkin CJ. 2019 Impaired social behaviour and molecular mediators of associated neural circuits during chronic *Toxoplasma gondii* infection in female mice. *Brain Behav. Immun.* **80**, 88–108. (doi:10.1016/j.bbi.2019.02.028)
21. Wang T *et al.* 2019 From inflammatory reactions to neurotransmitter changes: implications for understanding the neurobehavioral changes in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Behav. Brain Res.* **359**, 737–748. (doi:10.1016/j.bbr.2018.09.011)
22. Lang D *et al.* 2018 Chronic *Toxoplasma* infection is associated with distinct alterations in the synaptic protein composition. *J. Neuroinflammation* **15**, 216. (doi:10.1186/s12974-018-1242-1)
23. Sarcion ME, Gherardi A. 2000 Cytokines involved in Toxoplasmic encephalitis. *Scand. J. Immunol.* **52**, 534–543. (doi:10.1046/j.1365-3083.2000.00817.x)
24. Martynowicz J, Augusto L, Wek RC, Boehm SL, Sullivan WJ. 2019 Guanabenz reverses a key behavioral change caused by latent toxoplasmosis in mice by reducing neuroinflammation. *mBio* **10**, e00381-19. (doi:10.1128/mBio.00381-19)
25. Boillat M, Hammoudi PM, Dogga SK, Pagès S, Goubran M, Rodriguez I, Soldati-Favre D. 2020 Neuroinflammation-associated aspecific manipulation of mouse predator fear by *Toxoplasma gondii*. *Cell Rep.* **30**, 320–334.e6. (doi:10.1016/j.celrep.2019.12.019)
26. Sölvsten Burgdorf K *et al.* 2019 Large-scale study of *Toxoplasma* and cytomegalovirus shows an association between infection and serious psychiatric disorders. *Brain. Behav. Immun.* **79**, 152–158. (doi:10.1016/j.bbi.2019.01.026)
27. Fond G *et al.* 2018 Latent toxoplasma infection in real-world schizophrenia: results from the national FACE-SZ cohort. *Schizophr. Res.* **201**, 373–380. (doi:10.1016/j.schres.2018.05.007)
28. Stock AK, Dajkic D, Köhling HL, von Heinegg EH, Fiedler M, Beste C. 2017 Humans with latent toxoplasmosis display altered reward modulation of cognitive control. *Sci. Rep.* **7**, 10170. (doi:10.1038/s41598-017-10926-6)
29. Fabiani S, Pinto B, Bonuccelli U, Bruschi F. 2015 Neurobiological studies on the relationship between toxoplasmosis and neuropsychiatric diseases. *J. Neurol. Sci.* **351**, 3–8. (doi:10.1016/j.jns.2015.02.028)
30. Johnson HJ, Koshy AA. 2020 Latent toxoplasmosis effects on rodents and humans: how much is real and how much is media hype? *mBio* **11**, e02164-19. (doi:10.1128/mBio.02164-19)
31. Tyejbi S, Seizova S, Hannan AJ, Tonkin CJ. 2019 Toxoplasmosis: a pathway to neuropsychiatric disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **96**, 72–92. (doi:10.1016/j.neubiorev.2018.11.012)
32. Pittman KJ, Aliota MT, Knoll LJ. 2014 Dual transcriptional profiling of mice and *Toxoplasma gondii* during acute and chronic infection. *BMC Genomics* **15**, 806. (doi:10.1186/1471-2164-15-806)
33. Garfoot AL, Cervantes PW, Knoll LJ. 2019 Transcriptional analysis shows a robust host response to *Toxoplasma gondii* during early and late chronic infection in both male and female mice. *Infect. Immun.* **87**, e00024-19 (doi:10.1128/IAI.00024-19)
34. Benarroch EE. 2005 Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin. Proc.* **80**, 1326–1338. (doi:10.4065/80.10.1326)
35. Kaech S, Banker G. 2006 Culturing hippocampal neurons. *Nat. Protoc.* **1**, 2406–2415. (doi:10.1038/nprot.2006.356)
36. Kim D, Paggi JM, Park C, Bennett C, Salzberg SL. 2019 Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat. Biotechnol.* **37**, 907–915. (doi:10.1038/s41587-019-0201-4)
37. Gajria B *et al.* 2008 ToxoDB: an integrated *Toxoplasma gondii* database resource. *Nucleic Acids Res.* **36**, D553–D556. (doi:10.1093/nar/gkm981)
38. Thomas PD, Kejarival A, Guo N, Mi H, Campbell MJ, Muruganujan A, Lazareva-Ullitsky B. 2006 Applications for protein sequence–function evolution data: mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools. *Nucleic Acids Res.* **34**, W645–W650. (doi:10.1093/nar/gkl229)
39. Tomavo S, Fortier B, Soete M, Ansel C, Camus D, Dubremetz JF. 1991 Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **59**, 3750–3753. (doi:10.1128/iai.59.10.3750-3753.1991)
40. Garfoot AL, Wilson GM, Coon JJ, Knoll LJ. 2019 Proteomic and transcriptomic analyses of early and late-chronic *Toxoplasma gondii* infection shows novel and stage specific transcripts. *BMC Genomics* **20**, 859. (doi:10.1186/s12864-019-6213-0)
41. Behnke MS, Radke JB, Smith AT, Sullivan Jr WJ, White MW. 2008 The transcription of bradyzoite genes in *Toxoplasma gondii* is controlled by autonomous promoter elements. *Mol. Microbiol.* **68**, 1502–1518. (doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06249.x)
42. Waldman BS, Schwarz D, Wadsworth MH, Saeij JP, Shalek AK, Lourido S. 2020 Identification of a master regulator of differentiation in *Toxoplasma*. *Cell* **180**, 359–372.e16. (doi:10.1016/j.cell.2019.12.013)
43. Buchholz KR, Fritz HM, Chen X, Durbin-Johnson B, Rocke DM, Ferguson DJ, Conrad PA, Boothroyd JC. 2011 Identification of tissue cyst wall components by transcriptome analysis of *in vivo* and *in vitro* *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *Eukaryot. Cell* **10**, 1637–1647. (doi:10.1128/EC.05182-11)
44. Plattner F, Soldati-Favre D. 2008 Hijacking of host cellular functions by the Apicomplexa. *Annu. Rev. Microbiol.* **62**, 471–487. (doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162802)
45. Krishnamurthy S, Saeij JP. 2018 *Toxoplasma* does not secrete the GRA16 and GRA24 effectors beyond the parasitophorous vacuole membrane of tissue cysts. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **8**, 366. (doi:10.3389/fcimb.2018.00366)
46. Mayoral J, Shamamian P, Weiss LM. 2020 *In vitro* characterization of protein effector export in the Bradyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *mBio* **11**, e00046-20. (doi:10.1128/mBio.00046-20)
47. Radke JB, Lucas O, De Silva EK, Ma Y, Sullivan WJ, Weiss LM, Llinas M, White MW. 2013 ApiAP2 transcription factor restricts development of the *Toxoplasma* tissue cyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 6871–6876. (doi:10.1073/pnas.1300059110)
48. Walker R, Gissot M, Croken MM, Huot L, Hot D, Kim K, Tomavo S. 2013 The *Toxoplasma* nuclear factor TgAP2XI-4 controls bradyzoite gene expression and cyst formation. *Mol. Microbiol.* **87**, 641–655. (doi:10.1111/mmi.12121)
49. Khelifa AS *et al.* 2021 TgAP2IX-5 is a key transcriptional regulator of the asexual cell cycle division in *Toxoplasma gondii*. *Nat. Commun.* **12**, 116. (doi:10.1038/s41467-020-20216-x)
50. Lesage KM, Huot L, Mouveaux T, Courjol F, Saliou J-M, Gissot M. 2018 Cooperative binding of ApiAP2 transcription factors is crucial for the expression of virulence genes in *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res.* **46**, 6057–6068. (doi:10.1093/nar/gky373)
51. Hwang YS, Shin JH, Yang JP, Jung BK, Lee SH, Shin EH. 2018 Characteristics of infection immunity regulated by *Toxoplasma gondii* to maintain chronic infection in the brain. *Front. Immunol.* **9**, 158.
52. Fischer HG, Nitzgen B, Reichmann G, Groäy U, Hadding U. 1997 Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain. *Parasitol. Res.* **83**, 637–641. (doi:10.1007/s004360050311)
53. Ferguson DJP. 2004 Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int. J. Parasitol.* **34**, 347–360. (doi:10.1016/j.ijpara.2003.11.024)
54. Christiansen C *et al.* 2021 A novel *in vitro* model for mature *Toxoplasma gondii* Bradyzoites reveals their metabolome and a diminished role of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle. *bioRxiv*. (doi:10.1101/2021.01.15.426845)
55. Torres L, Robinson S-A, Kim D-G, Yan A, Cleland TA, Bynoe MS. 2018 *Toxoplasma gondii* alters NMDAR signaling and induces signs of Alzheimer's disease in wild-type, C57BL/6 mice. *J. Neuroinflammation* **15**, 57. (doi:10.1186/s12974-018-1086-8)

Primary brain cell infection by *Toxoplasma gondii* reveals the extent and dynamics of parasite differentiation and its impact on neuron biology.

Thomas Mouveaux ¹, Emmanuel Roger ¹, Alioune Gueye ¹, Fanny Eysert ², Ludovic Huot ¹, Benjamin Grenier-Boley ², Jean-Charles Lambert ² and Mathieu Gissot ^{1,*}.

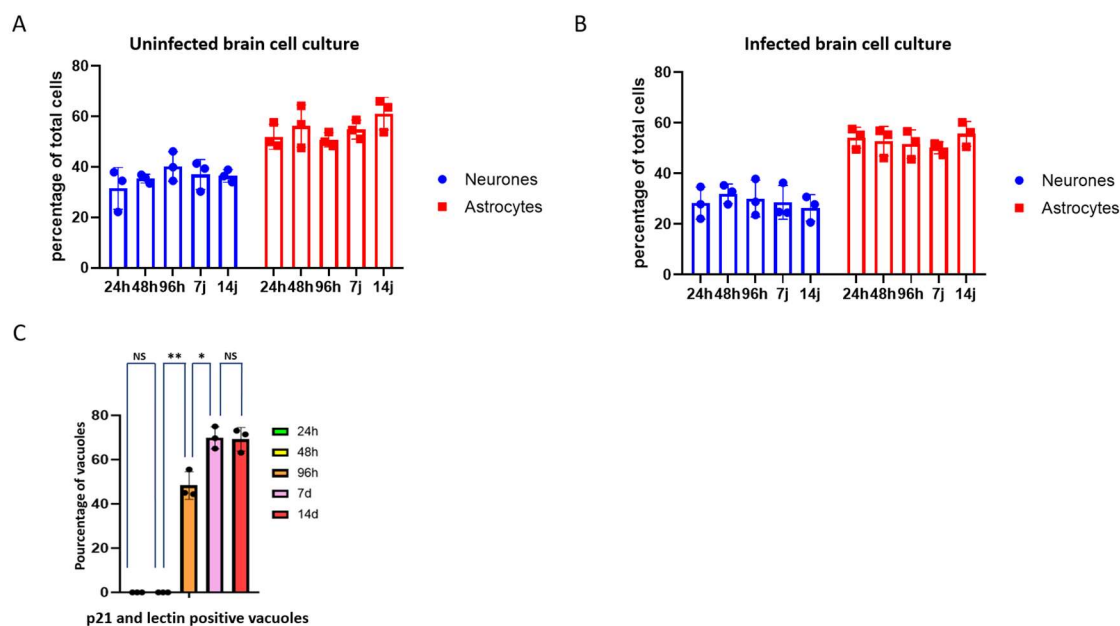


FIGURE S1

Figure S1: Dynamics of the *T. gondii* infected and uninfected primary brain cell culture.

Figure S1A: Bar graph representing the percentage of neurons (blue bars) and astrocytes (red bars) over time after 24h, 48h, 96h, 7 days and 14 days.

Figure S1B: Bar graph representing the percentage of neurons (blue bars) and astrocytes (red bars) over time after 24h, 48h, 96h, 7 days and 14 days after infection.

Figure S1C: Graphical representation of the number of vacuoles expressing both the tachyzoite marker TgSAG1 and presenting a lectin labelling. Bar graph representing the percentage of parasite vacuoles double positive for p21 and *D. bifluorus* lectin labelling over time after 24h (green), 48h (yellow), 96h (orange), 7 days (pink) and 14 days (red) of infection. A Student's t-test was performed; two-tailed p-value; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; NS: $p > 0,05$; mean \pm s.d. (n=3 independent experiments).

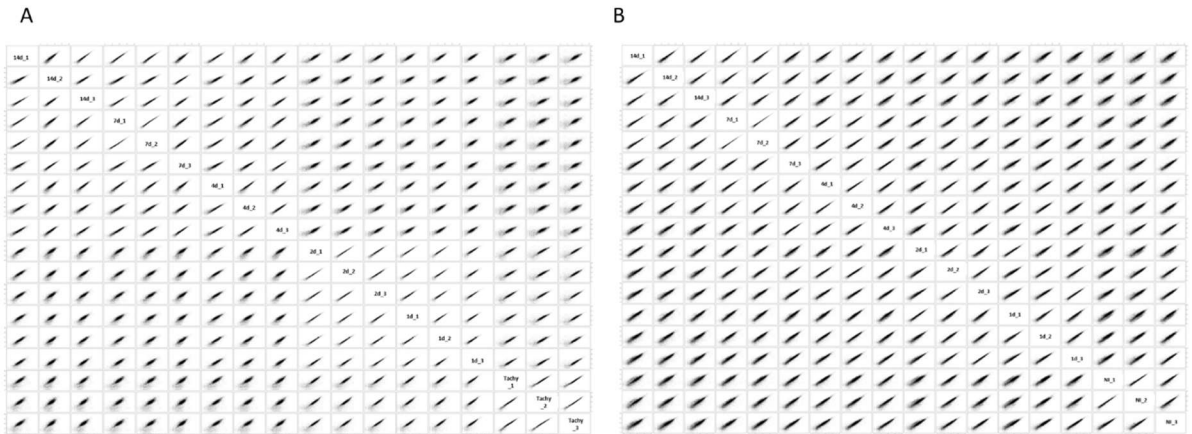


Figure S2

Figure S2: Scatter plot representation of raw reads counts.

Figure S2A: Scatter plot representation of raw reads counts for *T. gondii*. Each sample is compared to all the other samples.

Figure S2B: Scatter plot representation of raw reads counts for *R. norvegicus*. Each sample is compared to all the other samples.

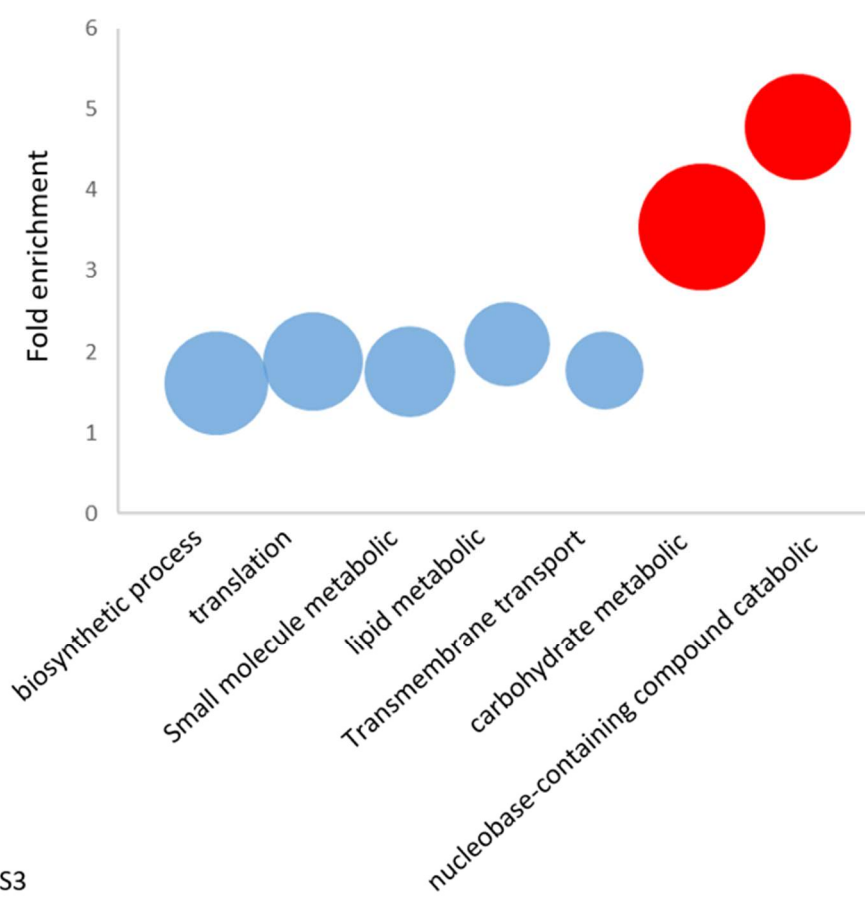


Figure S3

Figure S3: Gene ontology analysis for the 1200 common DEG for the 4d, 7d and 14d time points.

Each enriched pathway is indicated at the bottom. The y axis represents the fold enrichment for each enriched GO pathway. The size of the circle represents the $-\log_{10}$ of the p-value. Downregulated GO pathways are indicated in blue. Upregulated GO pathways are indicated in red.

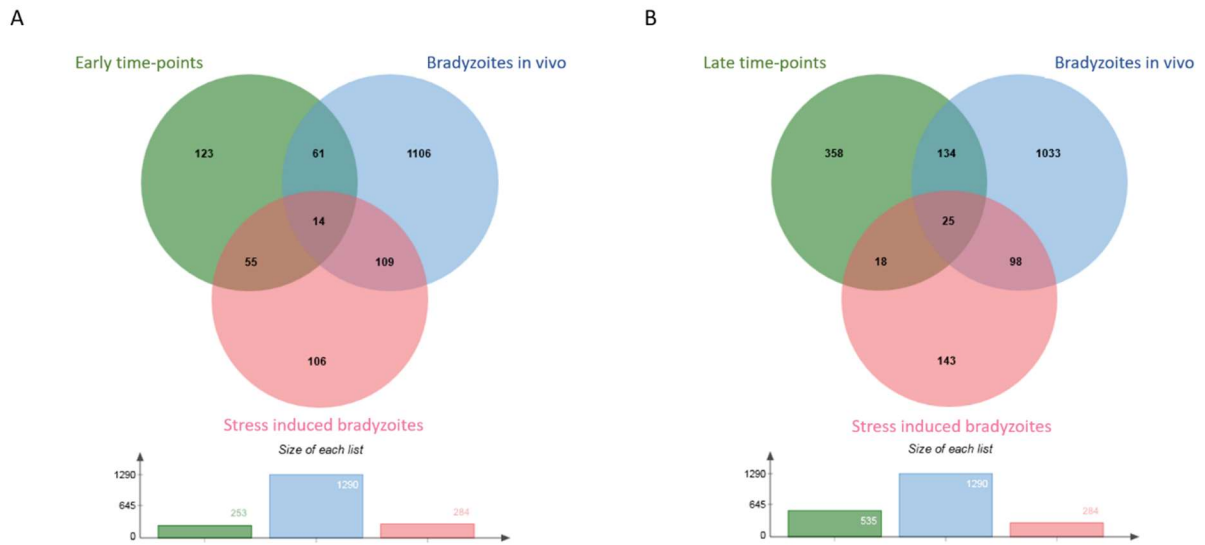


Figure S4

Figure S4: Comparison of the downregulated DEGs in brain cells, after stress induced differentiation and in *in vivo* derived bradyzoites.

Figure S4A: Venn diagram of the identified downregulated DEGs common for the 1d and 2d time-points (green circle), the stress-induced downregulated DEGs (red circle) and the *in vivo* derived bradyzoites downregulated DEGs (blue circle). Number of unique or shared DEGs are indicated. At the bottom, the size of each list of DEGs is indicated.

Figure S4B: Venn diagram of the identified downregulated DEGs common for the 4d, 7d and 14d time-points (green circle), the stress-induced downregulated DEGs (red circle) and the *in vivo* derived bradyzoites downregulated DEGs (blue circle). Number of unique or shared DEGs are indicated. At the bottom, the size of each list of DEGs is indicated.

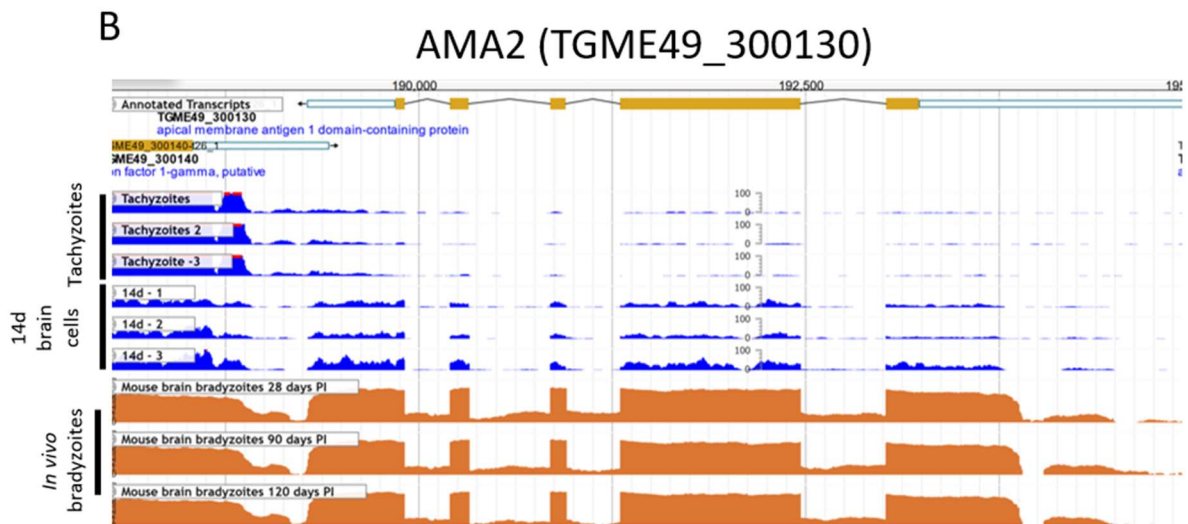
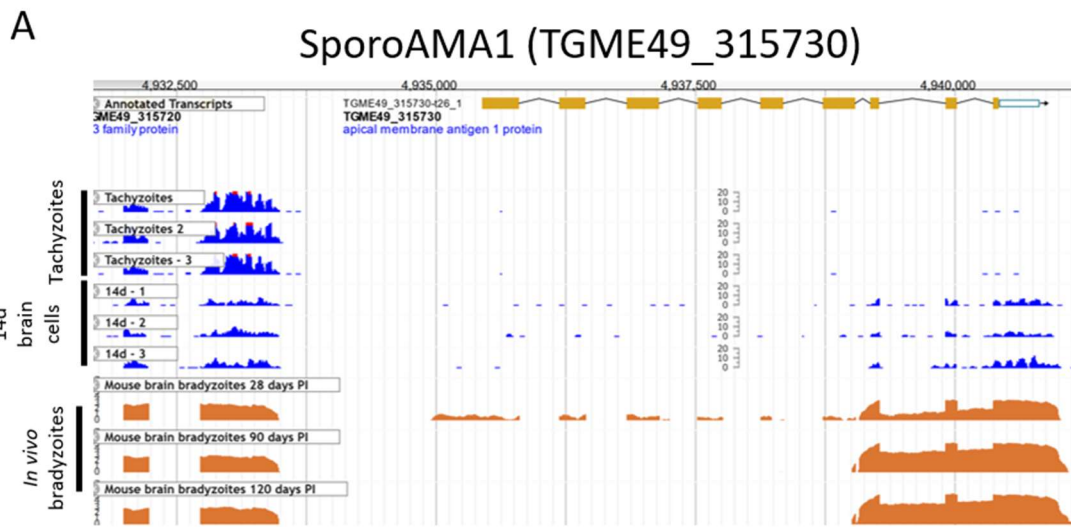


Figure S5

Figure S5: Analysis of the read coverage for Sporozoite AMA1 and AMA2 in different samples

Figure S5A: Read coverage for Sporozoite AMA1. The read coverage for the triplicate samples of tachyzoites, 14d brain cell culture and from *in vivo* bradyzoite [40] samples is represented. The gene number is indicated at the top of the figure.

Figure S5B: Read coverage for AMA2. The read coverage for the triplicate samples of tachyzoites, 14d brain cell culture and from *in vivo* bradyzoite [40] samples is represented. The gene number is indicated at the top of the figure.

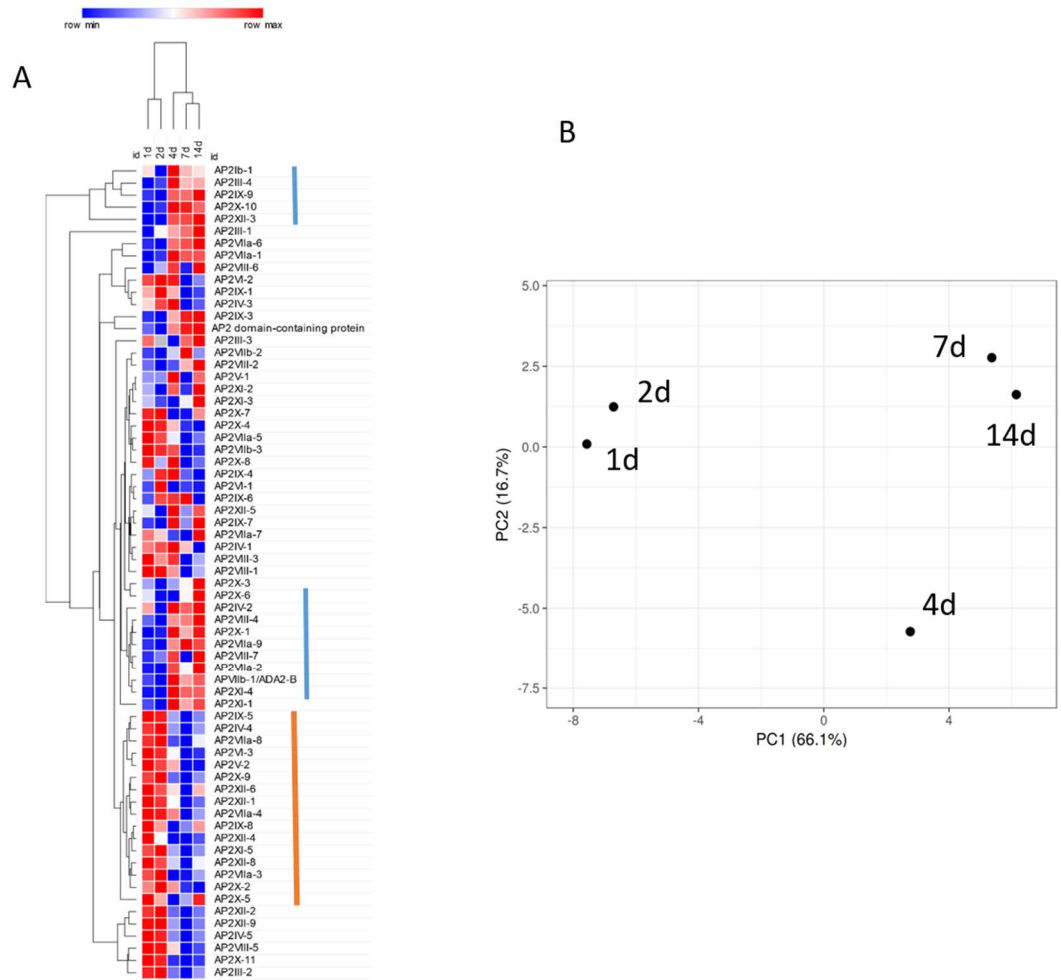


Figure S6

Figure S6: Analysis of ApiAP2 transcription factors during differentiation.

Figure S6A: Clustering of annotated ApiAP2 transcription factors based on their expression during the infection of brain cells. Two bradyzoite clusters were identified (in blue). One tachyzoite cluster is identified (in orange).

Figure S6B: Principal component analysis based on the expression of ApiAP2 transcription factors.

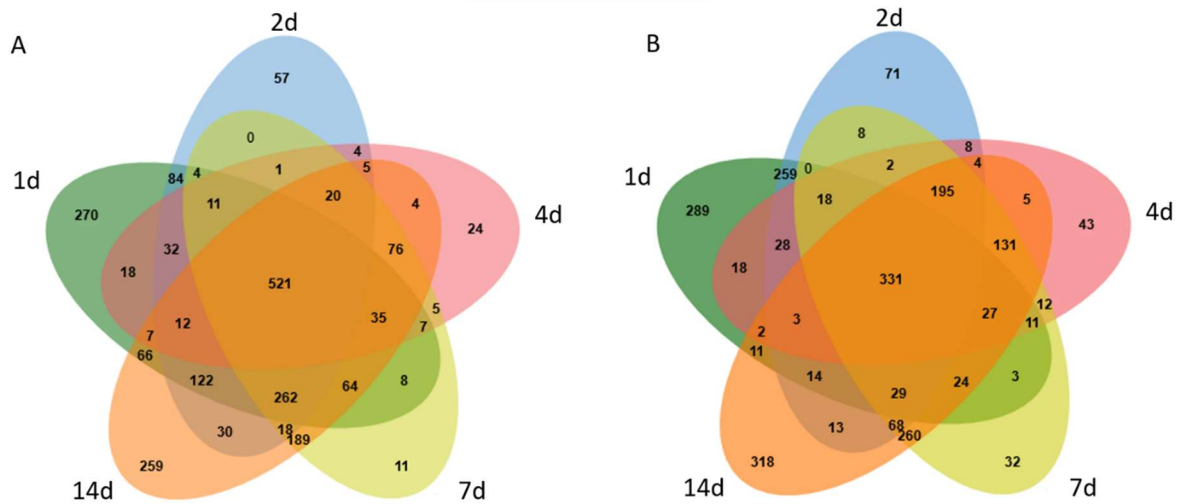


Figure S7

Figure S7: Analysis of identified *R. norvegicus* upregulated and downregulated DEGs in the infected primary brain cell culture when compare to uninfected samples.

Figure S7A: Venn diagram of the identified upregulated DEGs for each time point. DEGs for the 1d time point are grouped in a green circle. DEGs for the 2d time point are grouped in a blue circle. DEGs for the 4d time point are grouped in a red circle. DEGs for the 7d time point are grouped in a yellow circle. DEGs for the 14d time point are grouped in an orange circle. Number of unique or shared DEGs are indicated.

Figure S7B: Venn diagram of the identified downregulated DEGs for each time point. DEGs for the 1d time point are grouped in a green circle. DEGs for the 2d time point are grouped in a blue circle. DEGs for the 4d time point are grouped in a red circle. DEGs for the 7d time point are grouped in a yellow circle. DEGs for the 14d time point are grouped in an orange circle. Number of unique or shared DEGs are indicated.

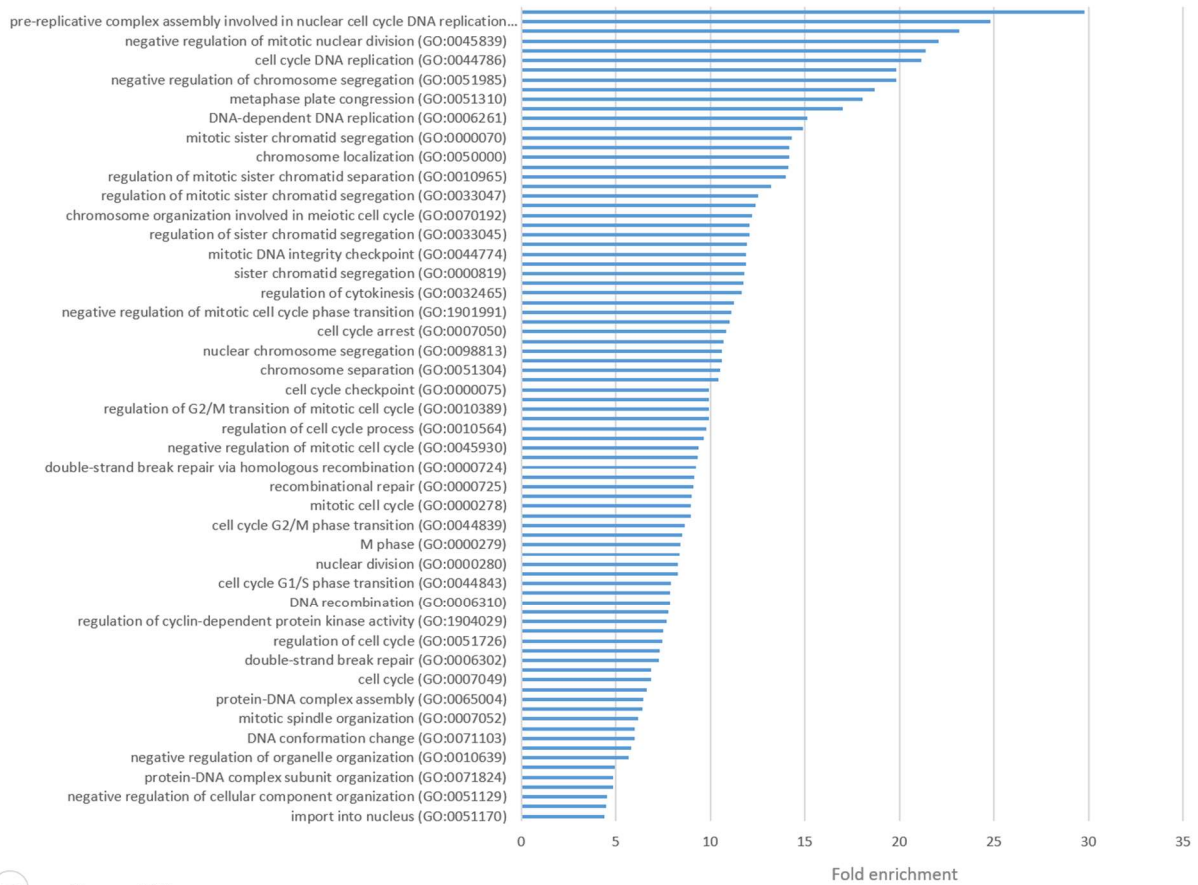


Figure S8A

Figure S8B

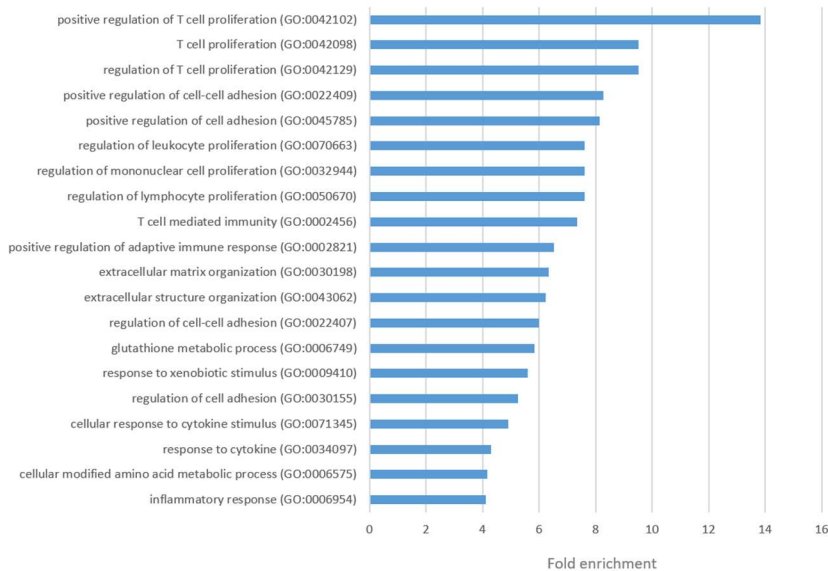


Figure S8C

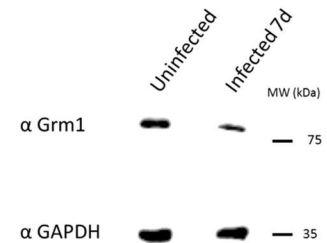


Figure S8: Gene ontology analysis of enriched pathways for DEGs in the *R. norvegicus* samples.

Figure S8A: GO pathway analysis for upregulated DEGs shared for the 1d and 2d time points. Pathways

were selected with a FDR of 0,05 and a minimum enrichment of 4. The name of each GO pathway is indicated on the left part of the figure. Bars represent the enrichment fold.

Figure S8B: GO pathway analysis for upregulated DEGs shared for the 7d and 14d time points. Pathways were selected with a FDR of 0,05 and a minimum enrichment of 4. The name of each GO pathway is indicated on the left part of the figure. Bars represent the enrichment fold.

Figure S8C: Western-blot showing the expression of Grm1 (VGLUT1) in infected or uninfected brain cell culture after 7 days. GAPDH is used as a loading control.

Comparison	Identified genes	DESeq2 DEG	Up	Down	Total cut-off >2
1d vs Tachyzoites	7 212	2203	610	305	915
2d vs Tachyzoites	7 381	3241	842	416	1258
4d vs Tachyzoites	7 745	4634	1220	1005	2225
7d vs Tachyzoites	7 768	5002	1843	1224	3067
14d vs Tachyzoites	7 697	4459	1749	1035	2784
2d vs 1d	7 112	37	41	4	45
4d vs 1d	7 593	2924	971	555	1526
7d vs 1d	7 641	3649	1216	741	1957
14d vs 1d	7 517	2881	1028	548	1576
4d vs 2d	7 642	3764	1042	635	1677
7d vs 2d	7 672	4521	1348	877	2225
14d vs 2d	7 587	3868	1205	689	1894
7d vs 4d	7 752	466	127	129	256
14d vs 4d	7 738	429	247	117	364
14d vs 7d	7 738	26	6	7	13

Table S1: Number of DEGs identified by DESEQ2 for the *T. gondii* genome.

Comparison	Identified genes	DESeq2 DEG	Up	Down	Total cut-off >2
1d vs NI	12 936	4642	1066	1523	2589
2d vs NI	12 978	3362	1050	1184	2234
4d vs NI	12 960	3114	837	784	1621
7d vs NI	12 985	3995	1150	1232	2382
14d vs NI	13 055	4907	1434	1690	3124
2d vs 1d	12 794	1242	377	86	463
4d vs 1d	12 813	2098	688	338	1026
7d vs 1d	12 875	3858	1070	645	1715
14d vs 1d	12 915	4882	1362	1136	2498
4d vs 2d	12 821	948	254	267	521
7d vs 2d	12 869	2465	504	469	973
14d vs 2d	12 905	3917	769	998	1767
7d vs 4d	12 857	1495	190	208	398
14d vs 4d	12 898	2921	537	951	1488
14d vs 7d	12 866	858	67	312	379

Table S2: Number of DEGs identified by DESEQ2 for the *R. norvegicus* genome.

Table S3: Gene expression for transcripts encoding proteins known to be involved in invasion.

Log₂ fold change (FC) for each transcript at each time point of the infected brain cell culture. Color gradient depends on the value of FC. Downregulated values are represented shades of green. Upregulated values are represented in shade of red. Transcripts that were not detected are indicated by a double dash line (--). For each transcript the gene identification number (gene ID) and the corresponding annotation is also presented.

Please refer to: <https://royalsocietypublishing.org/doi/suppl/10.1098/rsob.210053>

6.3 Résultats complémentaires :

Les résultats du séquençage d'ARN nous ont permis d'étudier l'impact de l'infection sur une population totale de cellules neuronales. Cependant, cette technique ne nous permet pas une étude spécifique de la cellule infectée voir de modifications induites par une infection proximale sur l'activité d'un neurone non infecté. La faible proportion de cellules présentant des kystes cérébraux suite à une primo-infection est-elle suffisante pour expliquer un changement de comportement chez le rongeur ou existe-t-il un signal de l'infection transmis des neurones infectés aux restes des neurones qui induirait une modification de leur activité ?

De plus, le développement d'un modèle de culture de parasites enkystés dans des cellules cérébrales ne nous permet pas de répondre à certaines questions comme l'étude de l'impact de l'infection du neurone sur la transmission du message synaptique des cellules infectées ou des cellules non-infectées en communication avec les cellules infectées.

Nous nous proposons donc d'étudier l'activité synaptique entre un neurone infecté et un neurone non infecté et les modifications d'activités potentielles des neurones non infecté en communication avec des neurones infectés.

Pour ce faire, nous avons continué une collaboration avec le laboratoire de Jean-Charles Lambert (U1011) afin de mettre au point un modèle d'infection de cellules cérébrales de rat dans un appareillage utilisant la microfluidique.

*6.3.1 Mise au point des conditions nécessaires à une infection par *T. gondii* de cellules cérébrales en microfluidique sur une durée de 14 jours*

Les cultures de neurones en microfluidique permettent une étude de l'activité de transmission nerveuse entre cellules notamment au niveau de la synapse et de son fonctionnement.

En partenariat avec le laboratoire du Dr Jean-Charles Lambert, avec qui nous avons développé la technique de culture de bradyzoïtes en cellules cérébrales, nous avons tenté de déterminer les conditions d'infection et de culture du parasite en microfluidique durant 14 jours. Les microfluidiques ayant reçu un dépôt de 50 000 cellules cérébrales de rat suivi d'une différenciation/maturation de 14 jours (figure 25) nous ont été fournies par l'équipe du laboratoire précédemment cité.

Nous avons déterminé au travers d'une succession d'essais "test" qu'une infection de 500 parasites dans le compartiment pré-synaptique permet dans nos conditions la formation de kystes parasitaires et une infection maintenue jusqu'au 14^{ème} jour post-infection sans toxicité excessive pour les cellules. Le niveau de milieu du compartiment infecté est délibérément maintenu inférieur à celui des deux autres compartiments durant la phase d'infection afin de maintenir un flux rentrant dans le compartiment pré-synaptique évitant un entrainement et une infection vers les deux autres compartiments (figure 26).

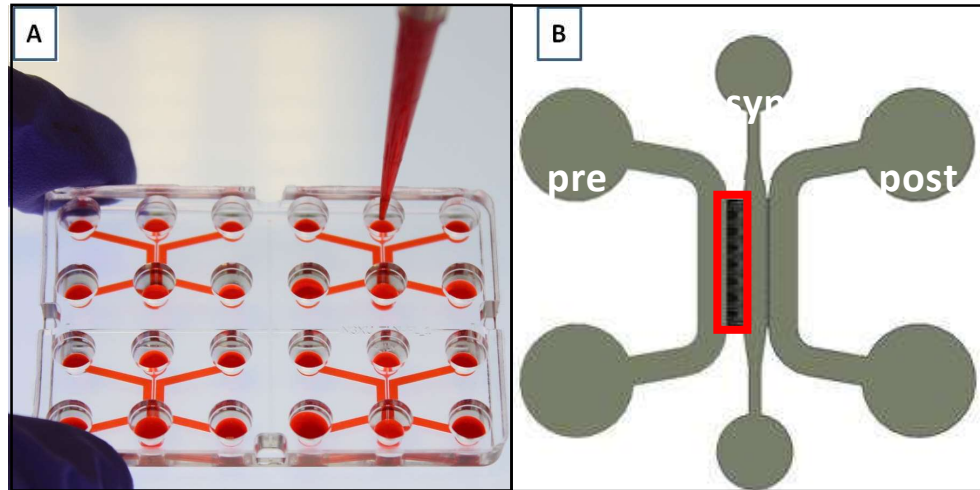


Figure 25. Photographie de 4 microfluidiques composées chacune d'un compartiment pré-synaptique (PRE), un compartiment synaptique (SYN) et un compartiment post-synaptique (POST) (A). Schéma d'une microfluidique présentant les 3 compartiments et l'emplacement des micro-canaux (rectangle rouge) permettant le passage exclusif des axones issus des neurones du compartiment PRE (B). Les cellules sont déposées dans les compartiments PRE et POST. Le compartiment SYN ne reçoit pas de cellules. Ce dernier est l'espace dans lequel se crée la jonction entre un neurone du compartiment PRE et un neurone du compartiment POST : la synapse.

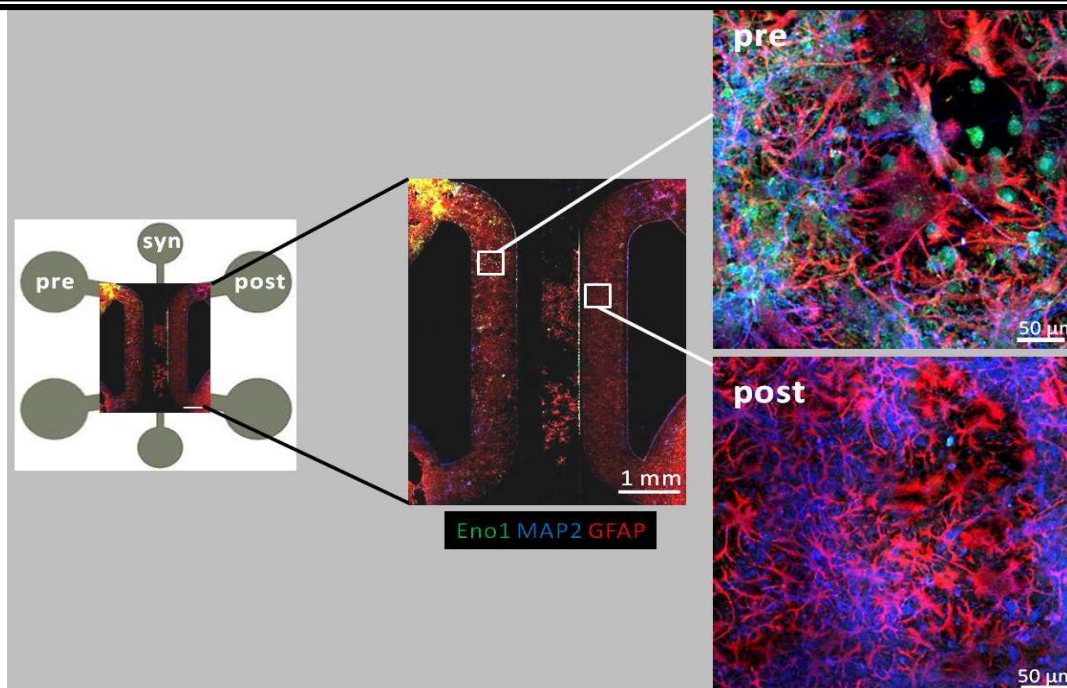


Figure 26. Prise d'images en microscopie à fluorescence par immuno-marquage sur une microfluidique après 4 jours d'infection. Le compartiment pré-synaptique est infecté par *T. gondii* et présente donc des vacuoles parasitophores en cours de conversion vers la forme kystique marquées en vert (anticorps anti-Enolase I, marqueur des bradyzoïtes), les astrocytes sont marqués en rouge (anti-GFAP) et les neurones en bleu (anti-MAP2).

Nous avons déterminé durant ces expériences le nombre de parasites pouvant être déposés, la proportion de milieu pouvant être renouvelé (les cultures de neurones étant très sensibles aux modifications brusques de l'environnement) et la mise en place de chambres humides afin d'éviter une évaporation trop importante du milieu. Nous avons ainsi pu établir les conditions optimales pour le maintien de la culture sur un temps long (14 jours de maturation des cellules cérébrales suivis de 14 jours d'infection). Cependant, des optimisations sont encore nécessaires afin de préserver le réseau synaptique (dans le compartiment synaptique) pendant toute la durée de l'expérience.

L'établissement de ce modèle en microfluidique va nous permettre de mieux comprendre les effets de l'infection d'un petit nombre de neurones sur l'activité des neurones non-infectés adjacents et celle des neurones non-infectés mais connectés à ceux infectés.

Discussion

7 Etude de la conversion tachyzoïte-bradyzoïte

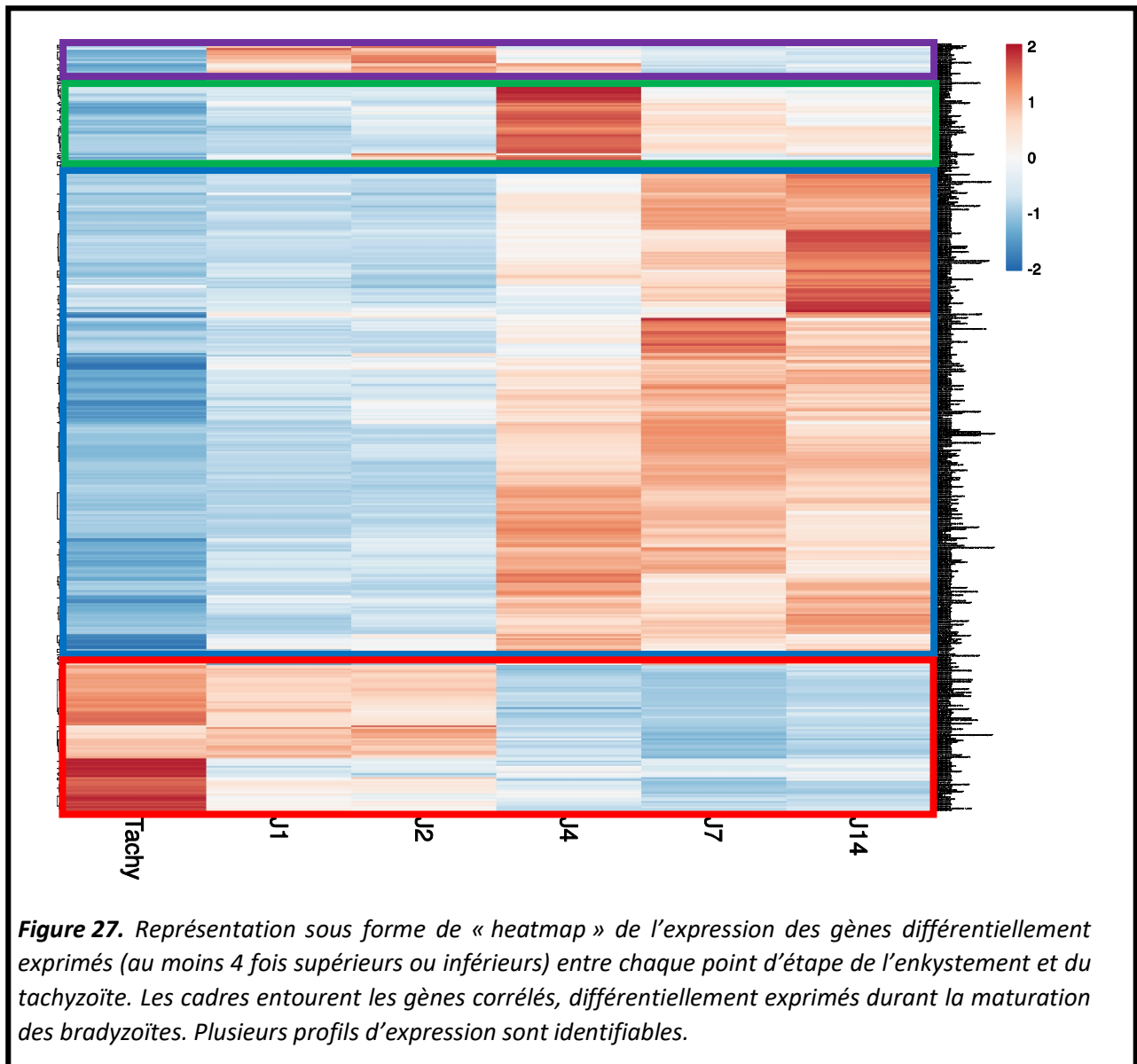
Chez l'Homme, l'interconversion entre forme proliférative et forme enkystée constitue un équilibre dynamique qui apparaît comme un système complexe et réversible. Le tachyzoïte prolifératif est sensible à divers traitements permettant de l'éliminer. Cependant, le bradyzoïte enkysté n'est pas sensible aux diverses stratégies médicamenteuses testées (325) ce qui constitue un des problèmes majeurs dans la lutte contre cette parasitose chez l'Homme. Des études détaillées sur le transcriptome et le protéome menées tout au long du cycle de vie de *T. gondii* ont révélé que certains ARNm et protéines sont plus spécifiquement exprimés dans l'un ou l'autre des stades de développement (181,295,297). *T. gondii* a développé un système de reprogrammation lui permettant de contrôler de manière extrêmement dynamique et précise les profils d'expression correspondant à chaque phase de son cycle de vie. Cependant, les mécanismes qui organisent la régulation de l'expression des gènes au cours de cette transition restent mal compris, principalement en raison des limitations méthodologiques.

L'infection de cellules cérébrales de rat par le parasite permet une conversion spontanée du tachyzoïte vers le bradyzoïte. Cette technique nous a permis d'étudier les changements de l'expression des gènes qui s'opèrent lors de la conversion du tachyzoïte vers le bradyzoïte durant une longue période (14 jours). Nous avons observé une progressivité dans les changements d'expression et ces variations semblent être orchestrées par des changements successifs d'expression (Figure 27). Deux vagues de transcription clefs sont observées au cours de la différenciation dans ce modèle. La première a été observée à 1 et 2 jours post-infection et constitue l'initiation de la transition, caractérisée par l'expression de gènes propres à la forme bradyzoïte. Durant cette première étape, nous avons observé une expression concomitante de gènes spécifiques des deux formes. Ces données ont été corroborées par l'étude par immunofluorescence qui a permis d'identifier l'expression de TgSAG1 (marqueur des tachyzoïtes) dans des vacuoles positives au marquage par la lectine de *D. biflorus* (marqueur des bradyzoïtes). Dans une seconde étape, nous avons observé la répression des gènes spécifiques de la forme tachyzoïte à partir du 4^{ème} jour post-initiation de la différenciation (1649 DEG entre J4 et J1, dont 616 réprimés à J4 par rapport à J1). Nous avons donc 1033 gènes surexprimés entre J4 et J1 qui ne correspondent que pour un tiers (282 gènes) aux gènes surexprimés entre J1 et le tachyzoïte. Le reste des 751 gènes ne sont spécifiquement surexprimés qu'à partir de cette étape (J2). Parmi les 616 gènes réprimés à cette étape, la plupart sont des gènes spécifiques du tachyzoïte (572 gènes).

A partir de ces données, nous avons établi plusieurs changements de profils d'expression distincts qui ont lieu au cours de la différenciation :

- Le premier changement majeur du profil d'expression qui commence dès les premiers jours (J1 et J2) post-infection est caractérisé par l'induction de l'expression (ou la dérèpression) de gènes spécifiques à la forme enkystée (Figure 27 – cadre bleu). Ce profil s'affirme au cours du temps avec les mêmes gènes de plus en plus exprimés.

- Le deuxième changement majeur du profil d'expression qui prend forme dès J4 post-infection caractérisé par une répression des gènes spécifiques du tachyzoïte (Figure 27 – cadre rouge) et de gènes surexprimés durant la première vague.
- Un changement de profil mineur avec l'expression transitoire de certains gènes à J1 et J2 (Figure 27 – cadre violet).
- Un changement de profil mineur avec l'expression transitoire de certains gènes à J4 sans que leur expression se maintienne jusqu'à J7 et J14 (Figure 27 – cadre vert).



Les deux changements de profil d'expression majeurs semblent être caractéristiques de deux étapes chronologiquement distinctes l'une de l'autre.

Durant la première vague de changement, 1035 gènes sont différentiellement exprimés entre le profil d'expression du tachyzoïte et le profil correspondant au 1^{er} jour post-infection. Parmi les gènes de ce premier groupe, on compte ceux communément admis pour être des marqueurs du bradyzoïte tels

que ENO1, LDH2, BAG1 ou encore BRP1. La première vague de changement du profil d'expression génique est donc caractéristique d'une conversion rapide en réponse à un stimulus environnemental de différenciation. Cette vague d'expression se maintient alors jusqu'à J14.

La deuxième vague de changement majeur montre donc une répression des gènes communément admis pour être des marqueurs spécifiques de la forme tachyzoïte (SAG1, ENO2 et LDH1) et de 45 gènes surexprimés durant la première vague

Dans la figure 27, les cadres violet et vert pourraient représenter des gènes dont l'expression n'est nécessaire que de manière transitoire. Notamment, ces gènes pourraient induire ou soutenir les changements majeurs établis plus haut. Parmi ces gènes, on retrouve des gènes exprimés au début de la conversion puis réprimés à partir de J4 (cadre violet) et potentiellement impliqués dans la régulation de l'expression des gènes tels que TGME49_263670 (une protéine présentant une sous-unité méthyltransférase spécifique de l'ARN), TGME49_264860 présentant un domaine en doigt de zinc de type C3HC4 caractéristique de protéines impliquées dans la régulation de l'expression des gènes et la réponse au stress et TGME49_299030 présentant un domaine de liaison à l'ARN. On retrouve également des gènes surexprimés spécifiquement à partir de J4 (cadre vert) tel que le facteur de transcription AP2XI-1 et d'autres protéines présentant des domaines de liaison à l'ADN et/ou l'ARN (TGME49_245660, TGME49_286690 et TGME49_293460) susceptibles d'être responsables de la mise en place du profil de transcription du bradyzoïte.

Comment cette transition en 2 étapes est-elle réalisée ?

Le facteur de transcription BFD1 (TGME49_200385) a été précédemment identifié comme la « clef de voute » initiatrice de la différenciation vers la forme bradyzoïte (196). L'expression de BFD1 est contrôlée au niveau traductionnel. Cependant, le transcrit codant pour cette protéine est 2 à 2,5 fois plus abondant chez le bradyzoïte qu'au stade tachyzoïte pour chaque point d'étape dans notre analyse. Nous nous sommes intéressés aux 2980 cibles de BFD1 déterminées par une expérience de Cut&Run (196). Dans nos données, nous avons 2414 gènes surexprimés à J1 par rapport au tachyzoïte. Parmi ces gènes, 588 sur 2414 sont ciblés par BFD1 par comparaison avec les données issues de l'étude précédente (196). Les gènes à la fois surexprimés à J4 par rapport à J1 et ciblés par BFD1 sont au nombre de 843. En comparant les gènes de ces 2 ensembles, nous constatons que plus la différenciation progresse plus nous trouvons de cibles de BFD1 surexprimées ; les 588 gènes exprimés en début de conversion étant également surexprimés à J4. BFD1 est donc actif tout au long de la différenciation. Il apparaît dans notre étude que les gènes de la liste établie pour être des gènes cibles du facteur de transcription BFD1 sont donc exprimés tout au long de la conversion (de J1 à J14), et que BFD1 est un facteur de transcription nécessaire à l'induction mais pourrait être aussi nécessaire au maintien de la forme bradyzoïte.

D'autres facteurs que BFD1 ont été caractérisés pour leur implication dans le passage d'une forme parasitaire à une autre dans de précédentes études, certains ont été identifiés comme des facteurs favorisant la forme bradyzoïte (AP2XI-4 ; AP2IV-3) et d'autres comme des répresseurs (AP2IX-9, AP2IX-4 et AP2IV-4). AP2XI-4 a été décrit comme un facteur de transcription impliqué dans la régulation des gènes du bradyzoïte et son extinction entraînant une diminution du nombre de kystes formés chez la souris (301). Nos données montrent que AP2XI-4 n'est que légèrement surexprimé durant la 1ère étape (J1-J2) puis voit son expression doubler pour les points d'étape tardifs et aurait donc un rôle de régulation important pour le maintien de l'expression des marqueurs des bradyzoïtes au cours de la différenciation. Ceci est cohérent avec les données acquises sur ce facteur de transcription qui a été

décrit comme un facteur de soutien (et non d'initiation) à l'expression des gènes spécifiques des bradyzoïtes. Il est donc très probable que ce facteur de transcription ait une action de régulation durant les deux phases de l'enkystement. AP2IV-3 est surexprimé à partir de J1 (par rapport au tachyzoïte) puis son expression diminue à J4 dans nos données, ce qui semble cohérent avec une précédente étude (300) montrant que cette protéine est un activateur précoce de gènes du bradyzoïte.

Les facteurs de transcription répresseurs de la forme bradyzoïte (AP2IX-9, AP2IX-4 et AP2IV-4) continuent d'être transcrits au cours de la conversion (298,302,303). Ces 3 facteurs, bien que précédemment caractérisés comme des répresseurs de l'enkystement, présentent 3 profils de transcription différents s'étalant sur l'ensemble des points d'étape de l'enkystement dans nos données. D'autres facteurs ApiAP2 (TgAP2Ib-1, TgAP2IX-1, TgAP2IX-6 et TgAP2VI-2) ont été caractérisés comme pouvant jouer un rôle potentiel dans la transition du parasite vers le stade bradyzoïte (187). Dans nos données, TgAP2Ib-1 présente un profil atypique car nous observons une surexpression à chaque point d'étape sauf à J2 par rapport au tachyzoïte. TgAP2IX-1 et IX-6 sont surexprimés à chaque point d'étape de la conversion par rapport au tachyzoïte et TgAP2VI-2 est surexprimé durant les 4 premiers jours de la conversion dans nos données pour revenir à un niveau d'expression similaire au tachyzoïte aux points d'étape J7 et J14.

Parmi ces facteurs de transcription caractérisés pour avoir une activité importante lors du passage vers la forme chronique dans de précédentes études, nous observons une répartition qui ne semble pas exclusive à l'une des deux vagues majeures de régulation décrites plus haut (Figure 28). De plus, nous n'avons pas non plus observé une surexpression de facteurs de transcription ou de facteurs liés à la régulation épigénétique spécifiques à un point d'étape de la conversion. Ces données indiquent que la régulation de l'expression des gènes lors de la différenciation est le fruit d'une régulation complexe faisant intervenir de multiples acteurs.

Nous nous sommes aussi intéressés au facteur BFD2 (TGME49_311100). BFD1 et BFD2 sont impliqués dans une boucle d'activation réciproque aboutissant à la conversion du tachyzoïte en bradyzoïte (311). Nous avons observé une abondance accrue du transcrit codant pour BFD2 dans nos données. Celui-ci étant la cible de BFD1, il est attendu que son expression soit activée dès les premiers jours de différenciation. Nos données montrent une hausse de son expression par rapport au tachyzoïte dès J1 post infection, et celle-ci est maintenue à J2, J4, J7 et J14.

Il a été montré que la protéine BFD2 se lie au transcrit codant pour BFD1 pour en réguler positivement sa traduction. Cependant, BFD2 se lie également à d'autres messagers (375 séquences de transcrits qui semblent présenter une affinité variable à BFD2) (311). Parmi ces 375 transcrits, 126 sont retrouvés dans nos données comme étant surexprimés par rapport au tachyzoïte. En filtrant les données de liaison à BFD2, nous avons identifiés 105 transcrits cibles ayant la plus grande affinité pour BFD2 (soit au moins 2 fois plus de séquences immuno-précipitées avec BFD2 que dans le témoin). Parmi ces 105 gènes, 38 sont surexprimés dans nos conditions de changement de stade et 35 le sont dès le premier jour post-infection. Il apparaît donc que BFD2 serait un facteur déclencheur précoce de la conversion tachyzoïte-bradyzoïte. Ces cibles de BFD2 pourraient coder pour un facteur déclencheur de la seconde vague d'expression observée dans nos données. Parmi les 105 ARN ayant une affinité avec BFD2, nous avons recherché les facteurs de type ApiAP2 et les « Zinc Finger » ou autre motifs susceptibles de se lier à l'ADN et l'ARN. Nous avons ainsi identifié 9 protéines susceptibles d'être impliquées dans cette régulation en cascade (Tableau 6).

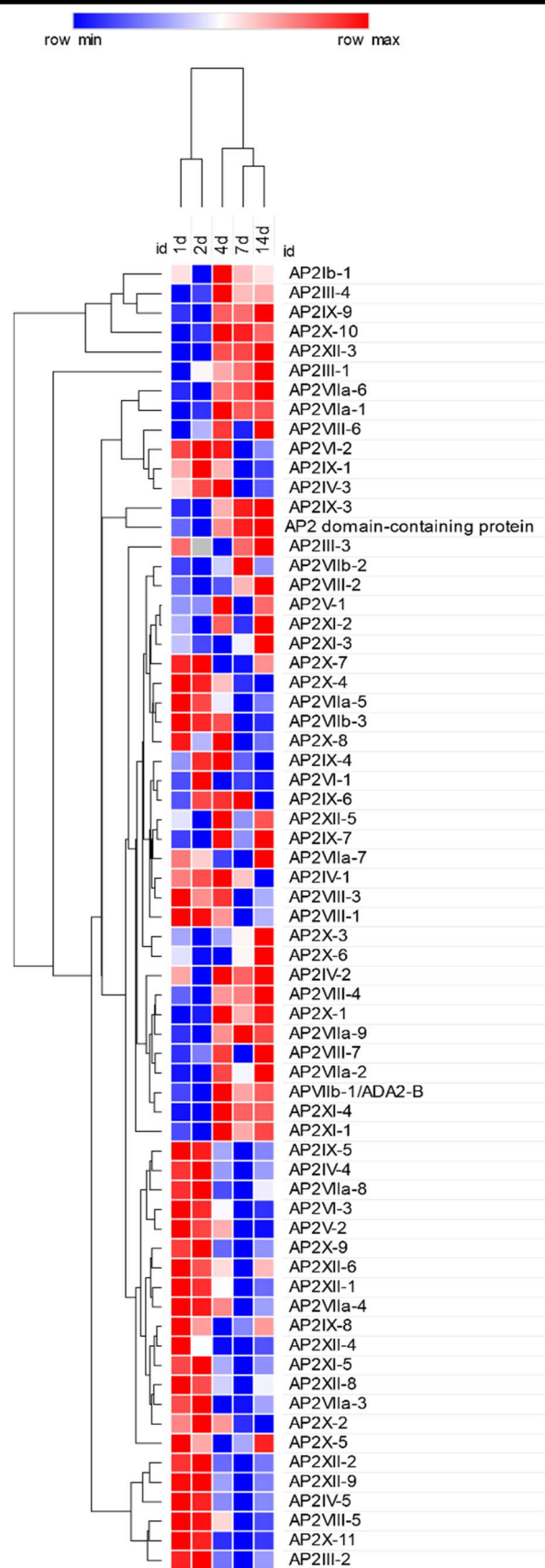


Figure 28. Issue de (324)

Représentation de l'expression transcriptomique de chaque ApiAP2 différemment exprimés au cours de la conversion entre le tachyzoïte et le bradyzoïte

TGME49_255310	zinc finger (CCCH type) motif-containing protein
TGME49_247730	AP2 domain transcription factor AP2XII-5 (AP2XII5)
TGME49_291330	RNA recognition motif-containing protein
TGME49_216220	AP2 domain transcription factor AP2XI-5 (AP2XI5)
TGME49_248270	zinc finger (CCCH type) motif-containing protein
TGME49_224630	zinc finger (CCCH type) motif-containing protein
TGME49_310900	AP2 domain transcription factor AP2XI-2 (AP2XI2)
TGME49_219120	zinc finger (CCCH type) motif-containing protein
TGME49_268380	RNA recognition motif-containing protein

Tableau 6. Liste des gènes susceptibles d'être impliqués dans la régulation de l'expression de gènes parmi les transcrits liés par BFD2

Il est à noter qu'un seul gène est retrouvé dans nos données comme étant surexprimé lors de la transition vers le bradyzoïte : TGME49_224630. Bien que son niveau de transcription ne soit pas une preuve de sa responsabilité dans la suite de la conversion, nous pouvons constater que ce gène présente une transcription basse dans le tachyzoïte et les points d'étape précoces (J1 et J2) de la conversion bradyzoïte. Sa transcription augmente de façon importante à J4 (x6 par rapport au tachyzoïte) avant d'être encore doublée entre J4 et J7-J14 (Figure 29).

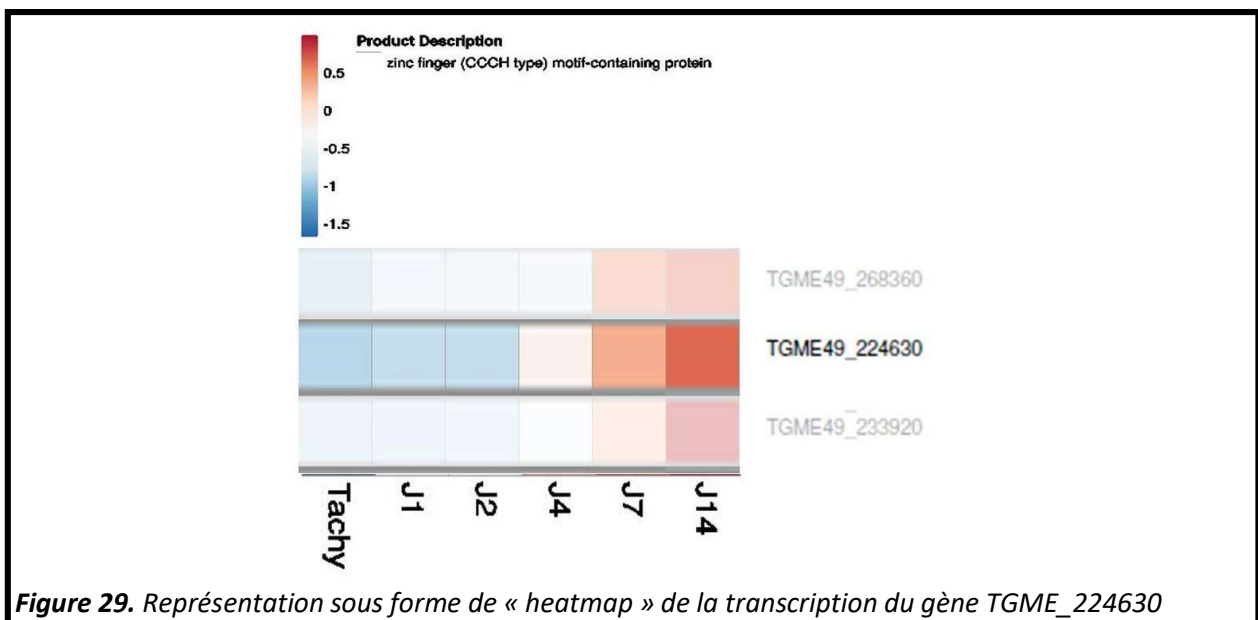


Figure 29. Représentation sous forme de « heatmap » de la transcription du gène TGME_224630

Nous pouvons établir l'hypothèse que la conversion de stade et les variations précoces soient initiées par BFD1 et BFD2 qui induise une dérégulation des gènes du tachyzoïtes. Dans ces cascades

d'expressions-répressions, une seconde vague de changement dans l'expression des gènes survient à J4 et pourrait être induite par un facteur régulateur exprimé suite à cet première vague et ciblé par BFD2 tel que TGME49_224630. Il serait intéressant de réaliser des mutants de ce gène et d'observer si son absence induit une forte perturbation dans la différenciation tardive du parasite.

Parmi les protéines présentant un motif « Zing finger » et surexprimées durant la conversion tachyzoïte vers bradyzoïte dans nos données (87 gènes) (Figure 30), certaines présentent le même profil d'expression que TGME49_224630, soit une expression quasi exclusive aux points d'étape du 4^{ème} jour et tardifs (J7 et J14). Quatre autres présentent une forte augmentation de leur transcription à partir de J4, qui continue d'augmenter à J7 et J14. Il serait donc également intéressant de tester ces 4 facteurs pour leur capacité à générer le deuxième changement de profil d'expression : TGME49_268360 ; TGME49_224630 ; TGME49_233920 ; TGME49_246160.

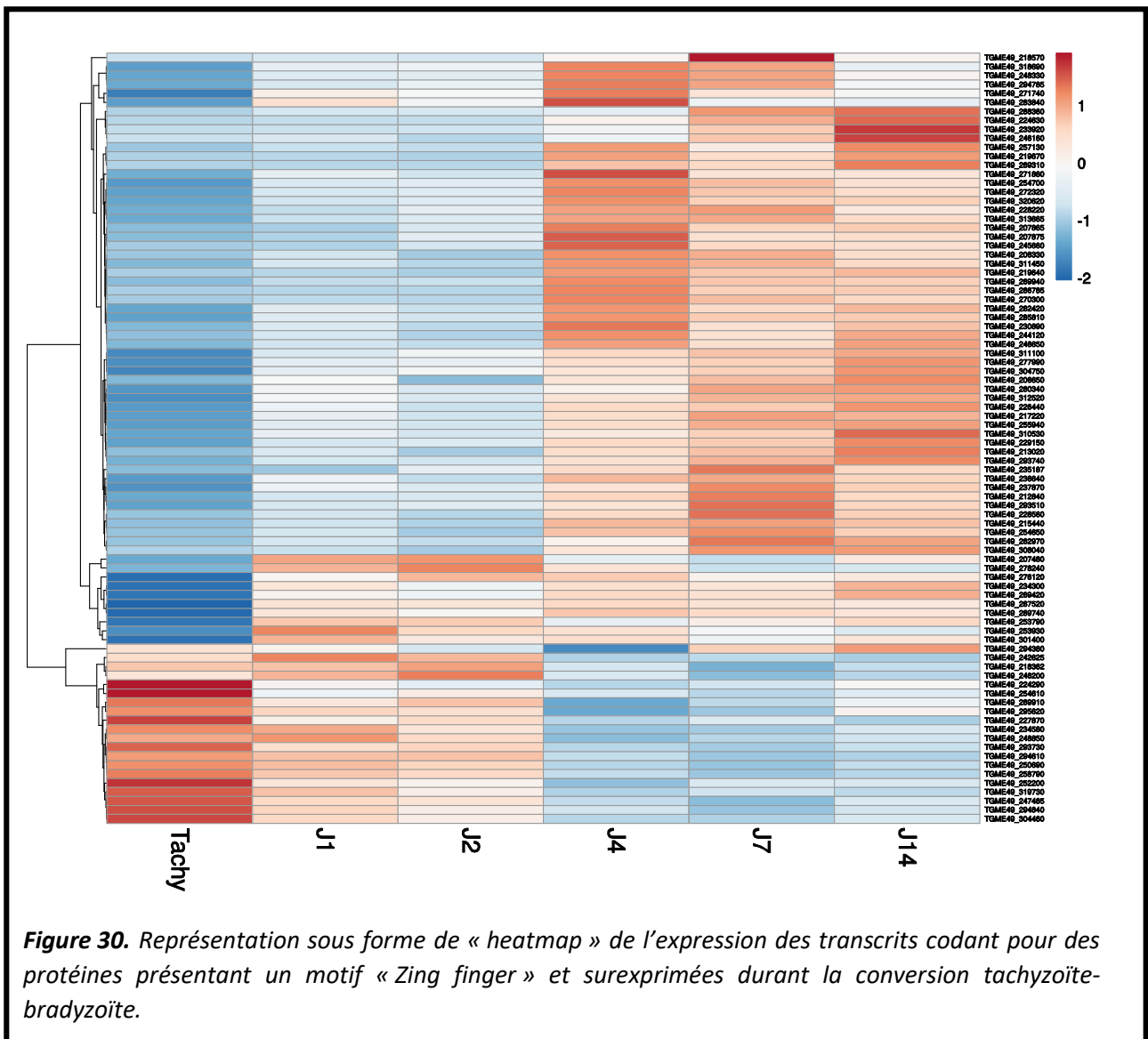


Figure 30. Représentation sous forme de « heatmap » de l'expression des transcrits codant pour des protéines présentant un motif « Zing finger » et surexprimées durant la conversion tachyzoïte-bradyzoïte.

Dans nos expérimentations, la conversion du tachyzoïte vers le bradyzoïte se fait en 2 vagues de transcription qui semblent, au moins en partie, orchestrées par une succession d'expression de facteurs de transcription et de traduction. Nous pouvons nous questionner quant aux similitudes et différences entre ce qui se passe naturellement dans un cerveau infecté et notre modèle d'étude. En effet, nous n'avons dans notre modèle qu'une fraction de la machinerie biologique impliquée dans les interactions entre le parasite et l'organisme, comme par exemple l'absence d'un système immunitaire complet. Cependant, il est intéressant de noter que les facteurs précédemment caractérisés comme étant impliqués dans la conversion et le bradyzoïte sont retrouvés dans notre modèle et exprimés de façon cohérente tout au long des divers points d'étapes de la conversion.

Il serait également intéressant de comprendre pourquoi cette conversion se fait en 2 étapes. Nous pouvons poser l'hypothèse qu'une conversion en 2 temps permettrait un retour vers la forme proliférative en cas d'environnement non adapté au bradyzoïte. Pour vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire de pouvoir mettre en évidence l'existence du premier profil d'expression génique bradyzoïte et l'absence du deuxième changement de profil au sein de cellules autres que des neurones ou des cellules musculaires tel que des fibroblastes par exemple. Pour ce faire, un séquençage d'ARN serait réalisé sous forme de « single-cell » permettant de détecter des changements de profil individualisés. Dans de précédents données générées par RNA-seq en cellules uniques (« single-cell ») (187), divers profils transcriptomiques ont été observés chez le tachyzoïte de type II. Malheureusement, la profondeur de séquençage n'est pas suffisante pour pouvoir identifier l'expression de l'ensemble des gènes. Une grande part des gènes que nous avons identifiés comme différentiellement exprimés dans nos données est absente de celles générées par le « single-cell » rendant difficile la comparaison entre nos deux approches.

8 La réplication du bradyzoïte

Le tachyzoïte présente une division synchronisée pour l'ensemble des parasites au sein d'une même vacuole. Toutes les 6 heures, un parasite mère donne naissance à deux parasites filles par endodyogénie. Au sein du kyste, la réplication ralentit de façon significative sans pour autant s'arrêter totalement et devient asynchrone. La réplication au sein du kyste est aujourd'hui très peu documentée et beaucoup d'interrogations restent en suspens. Les données obtenues par « Single-cell » sur des bradyzoïtes *in vitro* ont démontré qu'une sous-population de ces bradyzoïtes présentaient un profil transcriptomique différent avec une expression de gènes impliqués dans la division cellulaire (187), soutenant la possibilité pour le bradyzoïte de déréprimer une partie des gènes habituellement exprimés dans le tachyzoïte afin de revenir vers un état favorable à la division. Certains questionnements sont susceptibles d'être testés/analysés grâce à la technique de culture de parasites en neurones que nous avons développée.

- Pourquoi certains parasites vont effectuer une réplication quand le reste des bradyzoïtes au sein du même kyste restent latents ?
- Le bradyzoïte redevient-il momentanément tachyzoïte ou une forme intermédiaire « semi-proliférative » durant le temps où il opère cette division ?

Pour tenter d'apporter un début de réponse à ces questions, nous devons nous intéresser au profil d'expression de ce parasite en division afin de savoir s'il exprime certains marqueurs spécifiques du tachyzoïte ou du bradyzoïte. L'obtention de parasites mutants exprimant des versions de ces marqueurs étiquetés par des peptides fluorescents comme la GFP (Green Fluorescent Protein), le mCherry ou autres permettrait de suivre en vidéo-microscopie la division de parasites en culture de neurones avancée et d'observer l'expression de marqueurs spécifiquement tachyzoïtes ou bradyzoïtes couplés à un marqueur de la division (ex : Une souche de type II exprimant Sag1-GFP, Bag1-mCherry et une protéine étiquetée spécifique des cellules filles tel que IMC32) (327).

L'obtention de plusieurs recombinants pour divers couples de protéines tachyzoïte-bradyzoïte amènerait ainsi un début d'information sur le profil d'expression génique adopté par ces parasites réplicatifs au sein du kyste. En effet, l'expression de protéines spécifiques de la forme répllicative au sein de parasites en division dans un kyste indiquerait un changement transcriptionnel avec dérépression de gènes marqueurs du tachyzoïte. Cependant, lors de la différenciation les parasites n'expriment pas TgSAG1 et sont tout de même capable de se répliquer. Cette donnée indique que les bradyzoïtes réplicatifs au sein du kyste ne doivent pas retourner vers une expression des gènes proche de celle du tachyzoïte. Une étude récente sur des bradyzoïtes et tachyzoïtes remis en culture sur deux types de cellules hôtes différentes (HFF et astrocytes) apporte de nombreuses informations quant à la division du parasite enkysté (328). Les auteurs démontrent la capacité du bradyzoïte à se diviser sans avoir à opérer un retour vers une forme tachyzoïte. Le bradyzoïte conserve donc la capacité à accomplir un cycle cellulaire sans un passage, même transitoire, vers la forme tachyzoïte.

9 *Bradyzoïte et invasion*

Au cours d'expérimentations *in vitro*, certains kystes ont montré la possibilité de rompre et de libérer les bradyzoïtes qu'ils contiennent (329). Cependant, le nombre de kystes ne semble pas augmenter dans le cerveau de souris infectées de manière chronique. Cela indiquerait qu'en présence d'un système immunitaire compétent, les parasites libérés des kystes sont efficacement éliminés (249,330). Cependant, d'autres études ont montré la présence de kystes en grappe dans le cerveau de souris infectées laissant penser que l'invasion par le bradyzoïte pourrait avoir lieu (270). Quel est la nature et le devenir de ces bradyzoïtes ainsi libérés ?

Nature de ces parasites :

Nous pouvons supposer que ces parasites pourraient être des bradyzoïtes en cours de conversion vers les tachyzoïtes. La présence de kystes exprimant SAG1 et BAG1 dans des coupes de cerveau (252) suggère cette possibilité. La capacité réduite des bradyzoïtes à sortir des cellules après une stimulation calcique (331) est aussi un argument en faveur de cette hypothèse. Dans le cas où ces parasites seraient des tachyzoïtes, ils pourraient réenvahir les cellules du cerveau et soit être amenés à opérer une différenciation spontanée en bradyzoïte (comme observé dans notre modèle *in vitro*), soit rester en tachyzoïtes (ce qui causerait une encéphalite *in vivo* si le système immunitaire ne contrôle pas la prolifération de ces parasites). Cependant, on ne peut exclure que les bradyzoïtes soient capables de sortir activement (egress) des cellules, et il a été démontré que les bradyzoïtes conservent la capacité

à envahir des fibroblastes et des astrocytes (328). Il est donc probable que les bradyzoïtes libérés de kystes au sein du cerveau soient capables de produire des kystes dans les cellules adjacentes. Cependant, la maîtrise de l'infection par le système immunitaire de l'hôte pourrait réduire la possibilité de rencontrer ces infections en grappe. . Dans le cas où ces parasites seraient des bradyzoïtes, ils pourraient envahir les cellules du cerveau et former un nouveau kyste comme l'ont montré les expériences d'invasion par les bradyzoïtes des fibroblastes et des astrocytes (328).

Invasion des bradyzoïtes :

Il a été montré que cette forme du parasite entrait dans les cellules en utilisant la jonction mobile (332). Nous avons par ailleurs montré que le contenu des micronèmes et rhoptries semble changer entre les tachyzoïtes et les bradyzoïtes. Ces observations ont été corroborées *in vivo* sur des kystes issus de cerveaux de souris (296), et *in vitro* (332). Il semble donc que la machinerie d'invasion des parasites soit modifiée entre le tachyzoïte et le bradyzoïte. La raison de ces modifications n'est pas élucidée à ce jour. Cependant, elle semble avoir un rôle pour la production de kystes *in vivo* (332) ce qui suggère que cette spécialisation soit importante dans la réinvasion des cellules du cerveau par le bradyzoïte.

Il est aussi possible que la spécialisation de la machinerie d'invasion des bradyzoïtes soit liée au cycle de vie du parasite. En effet, les bradyzoïtes sont voués à envahir des entérocytes et pourraient donc avoir une machinerie dédiée à cet effet. Les tachyzoïtes ont *a contrario* un large spectre de cellules cibles. Des tests d'invasion de culture d'entérocytes avec des bradyzoïtes et des tachyzoïtes pourraient répondre à cette question. La possibilité de suivre l'invasion dans les cultures de cellules cérébrales présente l'opportunité d'étudier la capacité de bradyzoïtes matures (extraits de kystes cérébraux ou produits après 14 jours en culture de cellules cérébrales) à réenvahir des neurones, afin d'observer la dynamique de l'infection de ces cellules après invasion par ces bradyzoïtes. Une première information intéressante serait apportée par ce test d'invasion en comparaison avec des tachyzoïtes qui déterminerait l'efficacité du bradyzoïte à réenvahir des neurones.

10 Les inhibiteurs d'HDAC, entre outils d'études fondamentales et potentiels futurs composés thérapeutiques

De nombreux inhibiteurs d'HDAC impactent ces enzymes chez le parasite à de faibles concentrations. Malgré des indices de sélectivité élevés (après comparaison avec les IC_{50} de ces composés sur les cellules hôtes humaines), l'impact de certains de ces inhibiteurs sur les cellules hôtes n'a pas été mesuré avec précision. Des expériences de RNA-seq sur des cellules humaines non-infectées, traitées avec MC1742 (données non montrées) suggèrent un impact non-négligeable de ces types d'inhibiteurs sur l'expression des gènes de l'hôte. Pour étudier plus profondément l'impact de ces inhibiteurs sur les cellules hôtes, ces expériences pourraient être couplées à une immunoprécipitation de la chromatine des histones modifiées (acétylées) des cellules hôtes. Les données de RNA-seq sur ces cellules hôtes avec des concentrations très faibles mettent en lumière l'aspect potentiellement toxique

de ces composés et constituent une limite technique à l'utilisation directe des inhibiteurs d'HDAC comme traitement antiparasitaire. Notamment, les inhibiteurs d'HDAC de base hydroxamate sont connus de par leur capacité à chélater les ions métalliques et inhiber d'autres enzymes que les HDAC entraînant des effets imprévus (333). Nous avons testé un analogue de MC1742 (MC2125) qui nous a permis d'inhiber la croissance du parasite *in vitro* avec des concentrations de l'ordre du nanomolaire. Cependant, lors de nos investigations *in vivo*, le composé s'est avéré toxique à 30mg/kg et a entraîné la mort de plus de la moitié des souris testées. Les effets délétères sur certaines cellules sensibles au sein d'un organisme complexe constituent pourtant une limite de ces traitements potentiels futurs.

Outre les changements initiés par divers facteurs de transcription et de traduction impliqués dans la conversion de stade, un troisième volet épigénétique est à prendre en compte. La faible acétylation des histones situées au locus de nombreux promoteurs de gènes spécifiques des bradyzoïtes est essentielle dans le maintien de la répression de ces gènes chez le tachyzoïte (117,244). La dérégulation de ces mécanismes impliqués dans le niveau d'acétylation bouleverse la biologie du parasite et sa capacité adaptative aux divers hôtes biologiques qu'il traverse lors de son cycle de vie. Des travaux de recherche ont démontré que l'inhibition de TgHDAC3 aboutit à la dérégulation d'un grand nombre de gènes spécifiques du bradyzoïte mais surtout des stades spécifiques de l'hôte définitif (le félin) chez le tachyzoïte (117,244). Ce phénotype présente de grandes similarités avec celui obtenu sur des parasites tachyzoïtes traités par MC1742. En effet, le séquençage d'ARN des parasites traités par MC1742 a démontré une forte dérégulation des gènes des stades sexués chez le tachyzoïte et présente ainsi de grandes similarités avec le séquençage d'ARN des mutants d'extinction génique de TgMORC (326). Il apparaît donc évident que la régulation du niveau d'acétylation des histones est un élément clef de la régulation de l'expression des gènes spécifiques de stade. Cependant le rôle de TgMORC et plus largement le complexe associé à TgHDAC3 au stade bradyzoïte n'a pas été exploré. En effet, il n'y a pas de différence en termes d'abondance du transcrite codant pour MORC entre le tachyzoïte et le bradyzoïte. Afin de connaître le rôle de TgMORC dans l'établissement des profils d'expression observés lors de la transition tachyzoïte-bradyzoïte, nous pourrions utiliser notre modèle *in vitro* afin de connaître sur quels promoteurs MORC se situe tout au long de la différenciation. L'obtention d'une souche mutante présentant une copie étiquetée de MORC serait une première étape dans la tentative de répondre à ces interrogations. Une immunoprécipitation de la chromatine sur cette souche avec un anticorps dirigé contre l'étiquette permettrait de voir où se fixe la protéine MORC dans le génome du bradyzoïte au cours de la conversion et dans la forme mature. De plus, une immunoprécipitation du complexe MORC en condition native nous permettrait de connaître ces partenaires et savoir si certains facteurs de transcription se lient à MORC chez le bradyzoïte. Cependant, cette technique semble difficilement réalisable considérant la très faible quantité de matériel obtenu dans les conditions de culture *in vitro*. Le recours à la technique de biotinylation de proximité pourrait permettre d'identifier les protéines du complexe MORC dans des conditions où le matériel de départ est en quantité restreinte. L'obtention d'un parasite recombinant présentant une extinction génique inducible pour MORC pourrait aussi permettre d'étudier son activité au sein des bradyzoïtes par observation microscopique et séquençage d'ARN de bradyzoïtes n'exprimant plus MORC. Ces expériences permettraient d'éclairer le rôle de l'épigénétique au cours de la différenciation de tachyzoïte à bradyzoïte

Chez le parasite, il apparaît que l'inhibition des HDAC parasitaires impacte des voies métaboliques et régulatrices de l'expression des gènes très variables en fonction de l'inhibiteur utilisé. En effet,

l'utilisation de l'inhibiteur FR235222 ciblant spécifiquement TgHDAC3 aboutit à un phénotype d'apparence bradyzoïte avec expression des marqueurs précoces de la paroi kystique et une expression génique perturbée. Les études publiées sur de nombreux autres inhibiteurs d'HDAC présentent des résultats différents avec, pour le cas de MC1742, le dérèglement de l'expression génique mais l'absence d'expression de marqueurs de la paroi kystique (autres exemples page 34 à 37). Il est à noter que seul FR235222 a été caractérisé pour cibler TgHDAC3. Les hydroxamates étant de petites molécules présentant une forte capacité à complexer les ions Zinc présent au sein de la poche catalytique des HDAC (333). Dans le cas de MC1742, sa structure chimique de base hydroxamate et les modélisations tridimensionnelles qui ont été réalisées laissent à penser que ce composé puisse entrer dans la poche des 5 TgHDAC et inhibe potentiellement plusieurs HDAC parasitaires (pan-iHDAC). La perturbation ainsi obtenue serait de ce fait le résultat d'effets cumulés de l'inhibition de plusieurs TgHDAC.

L'identification d'inhibiteurs spécifiques contre chacune des 5 TgHDAC de façon exclusive permettrait une étude approfondie du rôle et de l'importance de chacune de ces enzymes. Ces rôles sont très certainement fortement essentiels à la survie du parasite de par les difficultés à générer des mutants pour ces gènes.

Nous avons observé des effets de MC1742 très délétères sur les tachyzoïtes tant au niveau de la réplication que de l'expression génique. Le composé ne semble pas impacter le bradyzoïte déjà en place dans des conditions *in vitro* ou *in vivo* (kystes cérébraux dans les souris infectées et traitées MC1742). Cependant, il serait intéressant de reprendre ces kystes traités obtenus *in vitro* ou purifiés de cerveaux de souris afin de remettre en culture ces parasites et observer leur capacité à revenir vers la forme tachyzoïte. La non-disparition de ces kystes, déjà en place avant le traitement, est-elle suffisante pour conclure à l'inefficacité du composé sur cette forme parasitaire ? Un test similaire a déjà été mis en place (117) dans lequel les kystes ont été traités ex-vivo par le composé FR235222 puis les bradyzoïtes extraits et remis en culture. Ces parasites n'ont pas été capables de revenir vers la forme proliférative et de générer une plage de lyse dans un test dit de « plage de lyse ». Cependant, les kystes ont été traités durant 7 jours ex-vivo, et non en condition « *in vivo* » dans des souris traitées.

Outre ces inconvénients limitant l'utilisation des iHDAC comme traitement contre les parasitoses, l'intérêt de traitement synergique entre un ou plusieurs inhibiteurs d'HDAC et des traitements conventionnels tels que la pyriméthamine ou la sulfadiazine a été démontré (334). Cette approche vise à réduire la dose nécessaire de médicaments conventionnels, ce qui pourrait minimiser les effets secondaires de ces traitements (effets tératogènes de la pyriméthamine) tout en augmentant son efficacité. Les traitements combinés avec des inhibiteurs d'HDAC présentent de potentiels avantages tel que :

- L'amélioration de la sensibilité du parasite : les inhibiteurs HDAC peuvent rendre le parasite plus sensible aux médicaments antiparasitaires en modifiant sa régulation génique. Par exemple, l'acétylation accrue des histones due à l'inhibition des HDAC peut ouvrir l'accès aux gènes impliqués dans la réponse au traitement antiparasitaire, rendant ainsi le parasite plus vulnérable à l'action du médicament.
- Le ciblage de différentes voies métaboliques : en ciblant spécifiquement les mécanismes épigénétiques du parasite, un inhibiteur d'HDAC pourrait se voir associé à un composé ciblant d'autres

voies métaboliques afin de perturber simultanément plusieurs aspects de la survie et de la croissance de *T. gondii*.

- Réduction de la résistance aux médicaments : bien que le problème de résistance aux médicaments soit moins problématique pour *T. gondii* que pour d'autres parasites Apicomplexes tel que *P. falciparum*, la synergie avec des inhibiteurs HDAC pourrait aider à prévenir ou à surmonter ce problème.

- Multiplication de l'arsenal thérapeutique : les traitements combinés offrent de nouvelles options thérapeutiques pour les personnes atteintes d'infections à *T. gondii* et pour lesquelles les traitements conventionnels sont inadaptés.

Perspectives :

L'établissement du modèle de culture *in vitro* nous permet d'avoir accès à la dynamique de différenciation. Plusieurs utilisations de ce modèle ont été évoquées et nous avons par ailleurs débuté l'utilisation de criblages utilisant l'outil CRISPR-CAS9 développée par l'équipe du Dr Lourido (335). A travers l'utilisation de ce modèle, nous proposons de déterminer le niveau d'essentialité des protéines pour l'enkystement ou l'établissement du kyste mature. Nous souhaitons ainsi explorer quels sont les facteurs de transcription et les gènes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes qui pourraient avoir un rôle dans ces processus. La technique de CRISPR-CAS9 nous permet de le faire à plus grande échelle. Cette technique nous permettra aussi de pouvoir étudier les gènes essentiels à la différenciation bradyzoïte-tachyzoïte, un sujet encore peu exploré.

En plus d'explorer plus avant la biologie des bradyzoïtes, ce modèle va aussi permettre de tester des composés qui seraient capables d'éliminer les bradyzoïtes matures. En effet, nous avons maintenant accès *in vitro* à des kystes dont la nature est proche de ceux qui peuvent être extraits des cerveaux de souris. Un criblage à moyen débit est envisageable afin d'identifier ce type de composés qui pourraient être associés en combinaison avec d'autres traitements visant la forme proliférative du parasite.

Bibliographie

1. Morrissette NS, Sibley LD. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev.* mars 2002;66(1):21-38; table of contents.
2. Vaidya AB, Mather MW. Mitochondrial Evolution and Functions in Malaria Parasites. *Annu Rev Microbiol.* 1 oct 2009;63(1):249-67.
3. Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, et al. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology.* 2005;52(5):399-451.
4. Portman N, Slapeta J. The flagellar contribution to the apical complex: a new tool for the eukaryotic Swiss Army knife? *Trends Parasitol.* févr 2014;30(2):58-64.
5. Murai K, Culleton R, Hisaoka T, Endo H, Mita T. Global distribution of polymorphisms associated with delayed *Plasmodium falciparum* parasite clearance following artemisinin treatment: Genotyping of archive blood samples. *Parasitology International.* 1 juin 2015;64(3):267-73.
6. Haddad JPA, Dohoo IR, VanLeewen JA. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle — a Canadian perspective. *Can Vet J.* mars 2005;46(3):230-43.
7. Barragan A, Sibley LD. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* sept 2003;11(9):426-30.
8. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* déc 1995;172(6):1561-6.
9. Su C, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka JW, Sibley LD. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science.* 17 janv 2003;299(5605):414-6.
10. Sabin AB. ISOLATION OF A FILTRABLE, TRANSMISSIBLE AGENT WITH « NEUROLYTI » PROPERTIES FROM TOXOPLASMA-INFECTED TISSUES. *Science.* 26 août 1938;88(2278):189-91.
11. Wang JL, Huang SY, Behnke MS, Chen K, Shen B, Zhu XQ. The Past, Present, and Future of Genetic Manipulation in *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.* juill 2016;32(7):542-53.
12. Lescault PJ, Thompson AB, Patil V, Lirussi D, Burton A, Margarit J, et al. Genomic data reveal *Toxoplasma gondii* differentiation mutants are also impaired with respect to switching into a novel extracellular tachyzoite state. *PLoS One.* 30 déc 2010;5(12):e14463.
13. Soête M, Camus D, Dubremetz JF. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro. *Exp Parasitol.* juin 1994;78(4):361-70.
14. Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* avr 2012;25(2):264-96.

15. Boothroyd JC, Grigg ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol.* août 2002;5(4):438-42.
16. Dardé ML. *Toxoplasma gondii*, « new » genotypes and virulence. *Parasite.* sept 2008;15(3):366-71.
17. Minot S, Melo MB, Li F, Lu D, Niedelman W, Levine SS, et al. Admixture and recombination among *Toxoplasma gondii* lineages explain global genome diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14 août 2012;109(33):13458-63.
18. Shwab EK, Zhu XQ, Majumdar D, Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology.* avr 2014;141(4):453-61.
19. Carme B, Demar M, Ajzenberg D, Dardé ML. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerg Infect Dis.* avr 2009;15(4):656-8.
20. Hamilton CM, Black L, Oliveira S, Burrells A, Bartley PM, Melo RPB, et al. Comparative virulence of Caribbean, Brazilian and European isolates of *Toxoplasma gondii*. *Parasit Vectors.* 14 mars 2019;12(1):104.
21. Günay-Esiyok Ö, Gupta N. Cyclic GMP signaling during the lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. 2019.
22. Martorelli Di Genova B, Wilson SK, Dubey JP, Knoll LJ. Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for *Toxoplasma* sexual reproduction. *PLoS Biol.* août 2019;17(8):e3000364.
23. Wilking H, Thamm M, Stark K, Aebischer T, Seeber F. Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. *Sci Rep.* 3 mars 2016;6:22551.
24. Belluco S, Simonato G, Mancin M, Pietrobelli M, Ricci A. *Toxoplasma gondii* infection and food consumption: A systematic review and meta-analysis of case-controlled studies. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018;58(18):3085-96.
25. Krueger WS, Hilborn ED, Converse RR, Wade TJ. Drinking water source and human *Toxoplasma gondii* infection in the United States: a cross-sectional analysis of NHANES data. *BMC Public Health.* 10 juill 2014;14:711.
26. Baril L, Ancelle T, Goulet V, Thulliez P, Tirard-Fleury V, Carme B. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scand J Infect Dis.* 1999;31(3):305-9.
27. Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis.* 15 août 2008;47(4):554-66.
28. Ozgonul C, Besirli CG. Recent Developments in the Diagnosis and Treatment of Ocular Toxoplasmosis. *Ophthalmic Res.* 2017;57(1):1-12.

29. Derouin F, Pelloux H, ESCMID Study Group on Clinical Parasitology. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clin Microbiol Infect.* déc 2008;14(12):1089-101.
30. Hall SM. Congenital toxoplasmosis. *BMJ.* 1 août 1992;305(6848):291-7.
31. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 12 juin 2004;363(9425):1965-76.
32. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet.* 29 mai 1999;353(9167):1829-33.
33. McAuley JB. Congenital Toxoplasmosis. *J Pediatric Infect Dis Soc.* sept 2014;3 Suppl 1(Suppl 1):S30-35.
34. Wallon M, Kodjikian L, Binquet C, Garweg J, Fleury J, Quantin C, et al. Long-term ocular prognosis in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Pediatrics.* juin 2004;113(6):1567-72.
35. Fricker-Hidalgo H, Bulabois CE, Brenier-Pinchart MP, Hamidfar R, Garban F, Brion JP, et al. Diagnosis of toxoplasmosis after allogeneic stem cell transplantation: results of DNA detection and serological techniques. *Clin Infect Dis.* 15 janv 2009;48(2):e9-15.
36. Martino R, Bretagne S, Einsele H, Maertens J, Ullmann AJ, Parody R, et al. Early detection of *Toxoplasma* infection by molecular monitoring of *Toxoplasma gondii* in peripheral blood samples after allogeneic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 1 janv 2005;40(1):67-78.
37. Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail [Internet]. 2006 [cité 12 déc 2022]. Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation : rapport du groupe de travail « *Toxoplasma gondii* » de l'Afssa. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/content/toxoplasmose-%C3%A9tat-des-connaissances-et-%C3%A9valuation-du-risque-li%C3%A9-%C3%A0-l%E2%80%99alimentation-rapport-d-2>
38. Luft BJ, Hafner R, Korzun AH, Leport C, Antoniskis D, Bosler EM, et al. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team. *N Engl J Med.* 30 sept 1993;329(14):995-1000.
39. Basavaraju A. Toxoplasmosis in HIV infection: An overview. *Trop Parasitol.* 2016;6(2):129-35.
40. [Therapeutic management of HIV-infected subjects. Report of the expert group under the direction of Prof. J.F. Delfraissy, 1999]. *Presse Med.* 15 janv 2000;29(1):25-8.
41. Scherrer J, Iliev ME, Halberstadt M, Kodjikian L, Garweg JG. Visual function in human ocular toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol.* févr 2007;91(2):233-6.
42. Bejjanki H, Olaoye OA, Santos AH, Koratala A. Liver transplant, toxoplasmosis and kidney stones: connecting the dots. *BMJ Case Reports CP.* 1 févr 2019;12(2):e229197.
43. Dardé ML, Fougère É, Buxeraud J. Les médicaments de la toxoplasmose. *Actualités Pharmaceutiques.* 1 déc 2018;57(581, Supplement):22-6.
44. Rabaud C, May T, Lucet JC, Leport C, Ambroise-Thomas P, Canton P. Pulmonary toxoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus: a French National Survey. *Clin Infect Dis.* déc 1996;23(6):1249-54.

45. Conrad A, Le Maréchal M, Dupont D, Ducastelle-Leprêtre S, Balsat M, Labussière-Wallet H, et al. A matched case-control study of toxoplasmosis after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: still a devastating complication. *Clin Microbiol Infect.* juill 2016;22(7):636-41.
46. Hanisch B, Sprott K, Ardura MI. Pneumocystis jirovecii and toxoplasmosis prophylaxis strategies among pediatric organ transplantation recipients: A US National Survey. *Transpl Infect Dis.* août 2020;22(4):e13290.
47. Khurana S, Batra N. Toxoplasmosis in organ transplant recipients: Evaluation, implication, and prevention. *Tropical Parasitology.* déc 2016;6(2):123.
48. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* nov 2000;30(12-13):1217-58.
49. Wong SY, Remington JS. Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS.* mars 1993;7(3):299-316.
50. Bertranpetit E, Jombart T, Paradis E, Pena H, Dubey J, Su C, et al. Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin. *Infect Genet Evol.* mars 2017;48:150-5.
51. Shwab EK, Saraf P, Zhu XQ, Zhou DH, McFerrin BM, Ajzenberg D, et al. Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 juill 2018;115(29):E6956-63.
52. Dong H, Su R, Lu Y, Wang M, Liu J, Jian F, et al. Prevalence, Risk Factors, and Genotypes of *Toxoplasma gondii* in Food Animals and Humans (2000-2017) From China. *Front Microbiol.* 2018;9:2108.
53. Olsen A, Berg R, Tagel M, Must K, Deksné G, Enemark HL, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pigs, sheep, cattle, wild boars, and moose in the Nordic-Baltic region: A systematic review and meta-analysis. *Parasite Epidemiol Control.* mai 2019;5:e00100.
54. Guo M, Mishra A, Buchanan RL, Dubey JP, Hill DE, Gamble HR, et al. Development of Dose-Response Models to Predict the Relationship for Human *Toxoplasma gondii* Infection Associated with Meat Consumption. *Risk Anal.* mai 2016;36(5):926-38.
55. Buxton D, Innes EA. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology.* 1995;110 Suppl:S11-16.
56. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases E-Book. Elsevier Health Sciences; 2019. 5208 p.
57. Di Carlo P, Casuccio A, La Chiusa S, Mazzola A, Pampinella D, Romano A, et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: pre- and post-natal evaluation in Sicilian (Italy) epidemiological area. Preliminary data. *Parassitologia.* juin 2007;49(1-2):39-41.
58. Tridapalli E, Capretti M, Farneti G, Marangoni A, Cevenini R, Faldella G. Congenital toxoplasmosis: the importance of the western blot method to avoid unnecessary therapy in potentially infected newborns. *Acta Paediatr.* sept 2008;97(9):1298-300.

59. Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Peruzzi S, Zerbini L, Bommezzadri S, et al. Comparison between two real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Acta Biomed.* août 2006;77(2):75-80.
60. Hecker YP, Masson FM, Armendano JI, Cora J, Olivares CF, Gual I, et al. Evaluation of frequency of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp. and transmission routes in sheep from Humid Pampa, Argentina. *Acta Parasitol.* 26 juin 2018;63(2):416-21.
61. Hou ZF, Su SJ, Liu DD, Wang L le, Jia CL, Zhao ZX, et al. Prevalence, risk factors and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in sick pigs and stray cats in Jiangsu Province, eastern China. *Infect Genet Evol.* juin 2018;60:17-25.
62. Fuentes I, Rubio JM, Ramírez C, Alvar J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol.* avr 2001;39(4):1566-70.
63. Breeze AC. Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 6th edn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* mars 2007;92(2):F156.
64. Ben-Harari RR, Goodwin E, Casoy J. Adverse Event Profile of Pyrimethamine-Based Therapy in Toxoplasmosis: A Systematic Review. *Drugs R D.* déc 2017;17(4):523-44.
65. Hernandez AV, Thota P, Pellegrino D, Pasupuleti V, Benites-Zapata VA, Deshpande A, et al. A systematic review and meta-analysis of the relative efficacy and safety of treatment regimens for HIV-associated cerebral toxoplasmosis: is trimethoprim-sulfamethoxazole a real option? *HIV Med.* févr 2017;18(2):115-24.
66. Lynfield R, Eaton RB. Teratogen update: congenital toxoplasmosis. *Teratology.* sept 1995;52(3):176-80.
67. Dunay IR, Gajurel K, Dhakal R, Liesenfeld O, Montoya JG. Treatment of Toxoplasmosis: Historical Perspective, Animal Models, and Current Clinical Practice. *Clin Microbiol Rev.* oct 2018;31(4):e00057-17.
68. Lim P, Alker AP, Khim N, Shah NK, Incardona S, Doung S, et al. Pfmdr1 copy number and artemisinin derivatives combination therapy failure in falciparum malaria in Cambodia. *Malar J.* 12 janv 2009;8:11.
69. Porter SB, Sande MA. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med.* 3 déc 1992;327(23):1643-8.
70. Köhler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJ, et al. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science.* 7 mars 1997;275(5305):1485-9.
71. Dannemann B, McCutchan JA, Israelski D, Antoniskis D, Leport C, Luft B, et al. Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. A randomized trial comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfadiazine. The California Collaborative Treatment Group. *Ann Intern Med.* 1 janv 1992;116(1):33-43.

72. Katlama C, De Wit S, O'Doherty E, Van Glabeke M, Clumeck N. Pyrimethamine-clindamycin vs. pyrimethamine-sulfadiazine as acute and long-term therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis*. févr 1996;22(2):268-75.
73. Baggish AL, Hill DR. Antiparasitic agent atovaquone. *Antimicrob Agents Chemother*. mai 2002;46(5):1163-73.
74. Jacobson JM, Hafner R, Remington J, Farthing C, Holden-Wiltse J, Bosler EM, et al. Dose-escalation, phase I/II study of azithromycin and pyrimethamine for the treatment of toxoplasmic encephalitis in AIDS. *AIDS*. 30 mars 2001;15(5):583-9.
75. Harrell M, Carvounis PE. Current treatment of toxoplasma retinochoroiditis: an evidence-based review. *J Ophthalmol*. 2014;2014:273506.
76. McLeod R, Boyer K, Karrison T, Kasza K, Swisher C, Roizen N, et al. Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: the National Collaborative Chicago-Based, Congenital Toxoplasmosis Study. *Clin Infect Dis*. 15 mai 2006;42(10):1383-94.
77. Petersen E. Toxoplasmosis. *Semin Fetal Neonatal Med*. juin 2007;12(3):214-23.
78. Boyom FF, Fokou PVT, Tchokouaha LRY, Spangenberg T, Mfopa AN, Kouipou RMT, et al. Repurposing the open access malaria box to discover potent inhibitors of *Toxoplasma gondii* and *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob Agents Chemother*. oct 2014;58(10):5848-54.
79. Radke JB, Carey KL, Shaw S, Metkar SR, Mulrooney C, Gale JP, et al. High Throughput Screen Identifies Interferon γ -Dependent Inhibitors of *Toxoplasma gondii* Growth. *ACS Infect Dis*. 12 oct 2018;4(10):1499-507.
80. Spalenka J, Escotte-Binet S, Bakiri A, Hubert J, Renault JH, Velard F, et al. Discovery of New Inhibitors of *Toxoplasma gondii* via the Pathogen Box. *Antimicrob Agents Chemother*. févr 2018;62(2):e01640-17.
81. Alday PH, Doggett JS. Drugs in development for toxoplasmosis: advances, challenges, and current status. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:273-93.
82. Mui EJ, Schiehser GA, Milhous WK, Hsu H, Roberts CW, Kirisits M, et al. Novel triazine JPC-2067-B inhibits *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo. *PLoS Negl Trop Dis*. 5 mars 2008;2(3):e190.
83. Ferguson DJ, Huskinson-Mark J, Araujo FG, Remington JS. A morphological study of chronic cerebral toxoplasmosis in mice: comparison of four different strains of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*. 1994;80(6):493-501.
84. Djurković-Djaković O, Milenković V, Nikolić A, Bobić B, Grujić J. Efficacy of atovaquone combined with clindamycin against murine infection with a cystogenic (Me49) strain of *Toxoplasma gondii*. *J Antimicrob Chemother*. déc 2002;50(6):981-7.
85. Ferreira RA, de Oliveira AB, Gualberto SA, Miguel Del Corral JM, Fujiwara RT, Gazzinelli Guimarães PH, et al. New naphthoquinones and an alkaloid with in vitro activity against *Toxoplasma gondii* RH and EGS strains. *Exp Parasitol*. déc 2012;132(4):450-7.

86. Ferreira RA, Oliveira AB, Ribeiro MFB, Tafuri WL, Vitor RWA. *Toxoplasma gondii*: in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 2-hydroxy-3-(1'-propen-3-phenyl)-1,4-naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine. *Exp Parasitol.* juin 2006;113(2):125-9.
87. Ribeiro RCB, Ferreira PG, Borges A de A, Forezi L da SM, da Silva F de C, Ferreira VF. 1,2-Naphthoquinone-4-sulfonic acid salts in organic synthesis. *Beilstein J Org Chem.* 2022;18:53-69.
88. McFadden DC, Tomavo S, Berry EA, Boothroyd JC. Characterization of cytochrome b from *Toxoplasma gondii* and Q(o) domain mutations as a mechanism of atovaquone-resistance. *Mol Biochem Parasitol.* 30 avr 2000;108(1):1-12.
89. Nilsen A, Miley GP, Forquer IP, Mather MW, Katneni K, Li Y, et al. Discovery, synthesis, and optimization of antimalarial 4(1H)-quinolone-3-diarylethers. *J Med Chem.* 8 mai 2014;57(9):3818-34.
90. Lawres LA, Garg A, Kumar V, Bruzual I, Forquer IP, Renard I, et al. Radical cure of experimental babesiosis in immunodeficient mice using a combination of an endochin-like quinolone and atovaquone. *J Exp Med.* 27 juin 2016;213(7):1307-18.
91. McConnell EV, Bruzual I, Pou S, Winter R, Dodean RA, Smilkstein MJ, et al. Targeted Structure-Activity Analysis of Endochin-like Quinolones Reveals Potent Qi and Qo Site Inhibitors of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* Cytochrome bc1 and Identifies ELQ-400 as a Remarkably Effective Compound against Acute Experimental Toxoplasmosis. *ACS Infect Dis.* 9 nov 2018;4(11):1574-84.
92. Montazeri M, Sharif M, Sarvi S, Mehrzadi S, Ahmadpour E, Daryani A. A Systematic Review of In vitro and In vivo Activities of Anti-Toxoplasma Drugs and Compounds (2006-2016). *Front Microbiol.* 2017;8:25.
93. Mazumdar J, H Wilson E, Masek K, A Hunter C, Striepen B. Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29 août 2006;103(35):13192-7.
94. Ramakrishnan S, Docampo MD, MacRae JI, Ralton JE, Rupasinghe T, McConville MJ, et al. The intracellular parasite *Toxoplasma gondii* depends on the synthesis of long-chain and very long-chain unsaturated fatty acids not supplied by the host cell. *Mol Microbiol.* juill 2015;97(1):64-76.
95. El-Zawawy LA, El-Said D, Mossallam SF, Ramadan HS, Younis SS. Triclosan and triclosan-loaded liposomal nanoparticles in the treatment of acute experimental toxoplasmosis. *Exp Parasitol.* févr 2015;149:54-64.
96. El-Zawawy LA, El-Said D, Mossallam SF, Ramadan HS, Younis SS. Preventive prospective of triclosan and triclosan-liposomal nanoparticles against experimental infection with a cystogenic ME49 strain of *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop.* janv 2015;141(Pt A):103-11.
97. Shubar HM, Mayer JP, Hopfenmüller W, Liesenfeld O. A new combined flow-cytometry-based assay reveals excellent activity against *Toxoplasma gondii* and low toxicity of new bisphosphonates in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother.* mai 2008;61(5):1110-9.

98. Lourido S, Shuman J, Zhang C, Shokat KM, Hui R, Sibley LD. Calcium-dependent protein kinase 1 is an essential regulator of exocytosis in *Toxoplasma*. *Nature*. 20 mai 2010;465(7296):359-62.
99. Rutaganira FU, Barks J, Dhasan MS, Wang Q, Lopez MS, Long S, et al. Inhibition of Calcium Dependent Protein Kinase 1 (CDPK1) by Pyrazolopyrimidine Analogs Decreases Establishment and Reoccurrence of Central Nervous System Disease by *Toxoplasma gondii*. *J Med Chem*. 28 déc 2017;60(24):9976-89.
100. Francis SH, Turko IV, Corbin JD. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001;65:1-52.
101. Kirkman LA, Weiss LM, Kim K. Cyclic nucleotide signaling in *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation. *Infect Immun*. janv 2001;69(1):148-53.
102. Afifi MA, Al-Rabia MW. The immunomodulatory effects of rolipram abolish drug-resistant latent phase of *Toxoplasma gondii* infection in a murine model. *J Microsc Ultrastruct*. 2015;3(2):86-91.
103. Konrad C, Queener SF, Wek RC, Sullivan WJ. Inhibitors of eIF2 α dephosphorylation slow replication and stabilize latency in *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother*. avr 2013;57(4):1815-22.
104. Narasimhan J, Joyce BR, Naguleswaran A, Smith AT, Livingston MR, Dixon SE, et al. Translation regulation by eukaryotic initiation factor-2 kinases in the development of latent cysts in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*. 13 juin 2008;283(24):16591-601.
105. Benmerzouga I, Checkley LA, Ferdig MT, Arrizabalaga G, Wek RC, Sullivan WJ. Guanabenz repurposed as an antiparasitic with activity against acute and latent toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother*. nov 2015;59(11):6939-45.
106. Martynowicz J, Augusto L, Wek RC, Boehm SL, Sullivan WJ. Guanabenz Reverses a Key Behavioral Change Caused by Latent Toxoplasmosis in Mice by Reducing Neuroinflammation. *mBio*. 30 avr 2019;10(2):e00381-19.
107. Das I, Krzyzosiak A, Schneider K, Wrabetz L, D'Antonio M, Barry N, et al. Preventing proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit. *Science*. 10 avr 2015;348(6231):239-42.
108. Martynowicz J, Doggett JS, Sullivan WJ. Efficacy of Guanabenz Combination Therapy against Chronic Toxoplasmosis across Multiple Mouse Strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 20 août 2020;64(9):e00539-20.
109. Martynowicz J, Sullivan WJ. Rebound of cyst number following discontinuation of guanabenz treatment for latent toxoplasmosis. *Mol Biochem Parasitol*. sept 2021;245:111411.
110. Farhat DC, Swale C, Dard C, Cannella D, Ortet P, Barakat M, et al. A MORC-driven transcriptional switch controls *Toxoplasma* developmental trajectories and sexual commitment. *Nat Microbiol*. 2020;5(4):570-83.
111. Benedetti R, Conte M, Altucci L. Targeting Histone Deacetylases in Diseases: Where Are We? *Antioxid Redox Signal*. 1 juill 2015;23(1):99-126.

112. Vanagas L, Jeffers V, Bogado SS, Dalmaso MC, Sullivan WJ, Angel SO. Toxoplasma histone acetylation remodelers as novel drug targets. *Expert Rev Anti Infect Ther.* oct 2012;10(10):1189-201.
113. Andrews KT, Tran TN, Lucke AJ, Kahnberg P, Le GT, Boyle GM, et al. Potent antimalarial activity of histone deacetylase inhibitor analogues. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2008;52(4):1454-61.
114. Mukherjee P, Pradhan A, Shah F, Tekwani BL, Avery MA. Structural insights into the Plasmodium falciparum histone deacetylase 1 (PfHDAC-1): A novel target for the development of antimalarial therapy. *Bioorg Med Chem.* 1 mai 2008;16(9):5254-65.
115. Darkin-Rattray SJ, Gurnett AM, Myers RW, Dulski PM, Crumley TM, Allocco JJ, et al. Apicidin: a novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 nov 1996;93(23):13143-7.
116. Bougdour A, Maubon D, Baldacci P, Ortet P, Bastien O, Bouillon A, et al. Drug inhibition of HDAC3 and epigenetic control of differentiation in Apicomplexa parasites. *J Exp Med.* 13 avr 2009;206(4):953-66.
117. Maubon D, Bougdour A, Wong YS, Brenier-Pinchart MP, Curt A, Hakimi MA, et al. Activity of the histone deacetylase inhibitor FR235222 on Toxoplasma gondii: inhibition of stage conversion of the parasite cyst form and study of new derivative compounds. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2010;54(11):4843-50.
118. Tan J, Cang S, Ma Y, Petrillo RL, Liu D. Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents. *J Hematol Oncol.* 4 févr 2010;3:5.
119. Jones-Brando L, Torrey EF, Yolken R. Drugs used in the treatment of schizophrenia and bipolar disorder inhibit the replication of Toxoplasma gondii. *Schizophr Res.* 1 août 2003;62(3):237-44.
120. Strobl JS, Cassell M, Mitchell SM, Reilly CM, Lindsay DS. Scriptaid and suberoylanilide hydroxamic acid are histone deacetylase inhibitors with potent anti-Toxoplasma gondii activity in vitro. *J Parasitol.* juin 2007;93(3):694-700.
121. Araujo-Silva CA, De Souza W, Martins-Duarte ES, Vommaro RC. HDAC inhibitors Tubastatin A and SAHA affect parasite cell division and are potential anti-Toxoplasma gondii chemotherapeutics. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* avr 2021;15:25-35.
122. Jublot D, Cavailès P, Kamche S, Francisco D, Fontinha D, Prudêncio M, et al. A Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor with Pleiotropic In Vitro Anti-Toxoplasma and Anti-Plasmodium Activities Controls Acute and Chronic Toxoplasma Infection in Mice. *Int J Mol Sci.* 17 mars 2022;23(6):3254.
123. Loeuillet C, Touquet B, Oury B, Eddaikra N, Pons JL, Guichou JF, et al. Synthesis of aminophenylhydroxamate and aminobenzylhydroxamate derivatives and in vitro screening for antiparasitic and histone deacetylase inhibitory activity. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* avr 2018;8(1):59-66.

124. Murakoshi F, Bando H, Sugi T, Adeyemi OS, Nonaka M, Nakaya T, et al. Nullscript inhibits *Cryptosporidium* and *Toxoplasma* growth. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* déc 2020;14:159-66.
125. Zhang Y, Zhang Q, Li H, Cong H, Qu Y. In vitro and in vivo anti-*Toxoplasma* activities of HDAC inhibitor Panobinostat on experimental acute ocular toxoplasmosis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:1002817.
126. Dow GS, Chen Y, Andrews KT, Caridha D, Gerena L, Gettayacamin M, et al. Antimalarial activity of phenylthiazolyl-bearing hydroxamate-based histone deacetylase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2008;52(10):3467-77.
127. Kozikowski AP, Chen Y, Gaysin A, Chen B, D'Annibale MA, Suto CM, et al. Functional differences in epigenetic modulators-superiority of mercaptoacetamide-based histone deacetylase inhibitors relative to hydroxamates in cortical neuron neuroprotection studies. *J Med Chem.* 28 juin 2007;50(13):3054-61.
128. Jeffers V, Gao H, Checkley LA, Liu Y, Ferdig MT, Sullivan WJ. Garcinol Inhibits GCN5-Mediated Lysine Acetyltransferase Activity and Prevents Replication of the Parasite *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2016;60(4):2164-70.
129. Smith AT, Livingston MR, Mai A, Filetici P, Queener SF, Sullivan WJ. Quinoline derivative MC1626, a putative GCN5 histone acetyltransferase (HAT) inhibitor, exhibits HAT-independent activity against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2007;51(3):1109-11.
130. Sumpf K, Nast R, Downie B, Salinas G, Lüder CGK. Histone deacetylase inhibitor MS-275 augments expression of a subset of IFN- γ -regulated genes in *Toxoplasma gondii*-infected macrophages but does not improve parasite control. *Exp Parasitol.* sept 2017;180:45-54.
131. Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature.* 3 juin 1999;399(6735):491-6.
132. Jeffers V, Kamau ET, Srinivasan AR, Harper J, Sankaran P, Post SE, et al. TgPRELID, a Mitochondrial Protein Linked to Multidrug Resistance in the Parasite *Toxoplasma gondii*. *mSphere.* 2017;2(1):e00229-16.
133. Hanquier J, Gimeno T, Jeffers V, Sullivan WJ. Evaluating the GCN5b bromodomain as a novel therapeutic target against the parasite *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol.* 28 févr 2020;211:107868.
134. Fleck K, McNutt S, Chu F, Jeffers V. An apicomplexan bromodomain protein, TgBDP1, associates with diverse epigenetic factors to regulate essential transcriptional processes in *Toxoplasma gondii*. *mBio.* 31 août 2023;14(4):e0357322.
135. Khan A, Su C, German M, Storch GA, Clifford DB, Sibley LD. Genotyping of *Toxoplasma gondii* Strains from Immunocompromised Patients Reveals High Prevalence of Type I Strains. *Journal of Clinical Microbiology.* déc 2005;43(12):5881-7.
136. Lorenzi H, Khan A, Behnke MS, Namasivayam S, Swapna LS, Hadjithomas M, et al. Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nat Commun.* 7 janv 2016;7:10147.

137. Berná L, Marquez P, Cabrera A, Greif G, Francia ME, Robello C. Reevaluation of the *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* genomes reveals misassembly, karyotype differences, and chromosomal rearrangements. *Genome Res.* mai 2021;31(5):823-33.
138. Vivier E, Petitprez A. [The outer membrane complex and its development at the time of the formation of daughter cells in *Toxoplasma gondii*]. *J Cell Biol.* nov 1969;43(2):329-42.
139. Harding CR, Meissner M. The inner membrane complex through development of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium*. *Cell Microbiol.* mai 2014;16(5):632-41.
140. Nagel SD, Boothroyd JC. The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. *J Biol Chem.* 5 avr 1989;264(10):5569-74.
141. Tomavo S, Schwarz RT, Dubremetz JF. Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Mol Cell Biol.* oct 1989;9(10):4576-80.
142. Boothroyd JC, Hehl A, Knoll LJ, Manger ID. The surface of *Toxoplasma*: more and less. *Int J Parasitol.* janv 1998;28(1):3-9.
143. Lekutis C, Ferguson DJ, Grigg ME, Camps M, Boothroyd JC. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int J Parasitol.* oct 2001;31(12):1285-92.
144. Hakimi MA, Olias P, Sibley LD. *Toxoplasma* Effectors Targeting Host Signaling and Transcription. *Clin Microbiol Rev.* juill 2017;30(3):615-45.
145. Lima TS, Lodoen MB. Mechanisms of Human Innate Immune Evasion by *Toxoplasma gondii*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:103.
146. Joiner KA, Roos DS. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J Cell Biol.* 13 mai 2002;157(4):557-63.
147. Nichols BA, Chiappino ML, Pavesio CE. Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.* 1994;80(2):91-8.
148. Dos Santos Pacheco N, Tosetti N, Koreny L, Waller RF, Soldati-Favre D. Evolution, Composition, Assembly, and Function of the Conoid in Apicomplexa. *Trends Parasitol.* août 2020;36(8):688-704.
149. Hu K, Roos DS, Murray JM. A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol.* 18 mars 2002;156(6):1039-50.
150. Nichols BA, Chiappino ML. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Protozoology.* 1987;34(2):217-26.
151. Carruthers VB, Sibley LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol.* 1 juin 1997;73(2):114-23.
152. Striepen B. The apicoplast: a red alga in human parasites. *Essays Biochem.* 2011;51:111-25.

153. Dubois DJ, Soldati-Favre D. Biogenesis and secretion of micronemes in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.* mai 2019;21(5):e13018.
154. Hager KM, Carruthers VB. MARveling at parasite invasion. *Trends Parasitol.* févr 2008;24(2):51-4.
155. Mital J, Meissner M, Soldati D, Ward GE. Conditional expression of *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion. *Mol Biol Cell.* sept 2005;16(9):4341-9.
156. Plasticity and redundancy among AMA–RON pairs ensure host cell entry of *Toxoplasma* parasites | *Nature Communications* [Internet]. [cité 8 déc 2022]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/ncomms5098>
157. Reiss M, Viebig N, Brecht S, Fourmaux MN, Soete M, Di Cristina M, et al. Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol.* 5 févr 2001;152(3):563-78.
158. Van Epps HL. MIC1 and MIC3. *J Exp Med.* 7 févr 2005;201(3):318.
159. Huynh MH, Carruthers VB. *Toxoplasma* MIC2 Is a Major Determinant of Invasion and Virulence. *PLoS Pathog.* août 2006;2(8):e84.
160. Carruthers V, Boothroyd JC. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Current Opinion in Microbiology.* 1 févr 2007;10(1):83-9.
161. Griffith MB, Pearce CS, Heaslip AT. Dense granule biogenesis, secretion, and function in *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol.* nov 2022;69(6):e12904.
162. Mordue DG, Håkansson S, Niesman I, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp Parasitol.* juin 1999;92(2):87-99.
163. Blader IJ, Coleman BI, Chen CT, Gubbels MJ. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. *Annu Rev Microbiol.* 2015;69:463-85.
164. Suss-Toby E, Zimmerberg J, Ward GE. *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 6 août 1996;93(16):8413-8.
165. Charron AJ, Sibley LD. Molecular Partitioning during Host Cell Penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic.* 2004;5(11):855-67.
166. Billker O, Lourido S, Sibley LD. Calcium-dependent signaling and kinases in apicomplexan parasites. *Cell Host Microbe.* 18 juin 2009;5(6):612-22.
167. Building the Perfect Parasite: Cell Division in Apicomplexa | *PLOS Pathogens* [Internet]. [cité 8 déc 2022]. Disponible sur: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.0030078>

168. Alvarez CA, Suvorova ES. Checkpoints of apicomplexan cell division identified in *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* juill 2017;13(7):e1006483.
169. Gubbels MJ, White M, Szatanek T. The cell cycle and *Toxoplasma gondii* cell division: tightly knit or loosely stitched? *Int J Parasitol.* oct 2008;38(12):1343-58.
170. Kvaal CA, Radke JR, Guerini MN, White MW. Isolation of a *Toxoplasma gondii* cyclin by yeast two-hybrid interactive screen. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 9 avr 2002;120(2):187-94.
171. Hawkins LM, Naumov AV, Batra M, Wang C, Chaput D, Suvorova ES. Novel CRK-Cyclin Complex Controls Spindle Assembly Checkpoint in *Toxoplasma* Endodyogeny. *mBio.* 22 févr 2021;13(1):e0356121.
172. Agop-Nersesian C, Egarter S, Langsley G, Foth BJ, Ferguson DJP, Meissner M. Biogenesis of the inner membrane complex is dependent on vesicular transport by the alveolate specific GTPase Rab11B. *PLoS Pathog.* 29 juill 2010;6(7):e1001029.
173. Ranish JA, Hahn S. Transcription: basal factors and activation. *Current Opinion in Genetics & Development.* 1 avr 1996;6(2):151-8.
174. Blazek D, Kohoutek J, Bartholomeeusen K, Johansen E, Hulinkova P, Luo Z, et al. The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. *Genes Dev.* 15 oct 2011;25(20):2158-72.
175. Lemon KP, Grossman AD. Movement of Replicating DNA through a Stationary Replisome. *Molecular Cell.* 1 déc 2000;6(6):1321-30.
176. Shandilya J, Roberts SGE. The transcription cycle in eukaryotes: From productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms.* 1 mai 2012;1819(5):391-400.
177. Meissner M, Krejany E, Gilson PR, de Koning-Ward TF, Soldati D, Crabb BS. Tetracycline analogue-regulated transgene expression in *Plasmodium falciparum* blood stages using *Toxoplasma gondii* transactivators. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 22 févr 2005;102(8):2980-5.
178. He H, Brenier-Pinchart MP, Braun L, Kraut A, Touquet B, Couté Y, et al. Characterization of a *Toxoplasma* effector uncovers an alternative GSK3/ β -catenin-regulatory pathway of inflammation. *Elife.* 15 oct 2018;7:e39887.
179. Huang Z, Liu H, Nix J, Xu R, Knoverek CR, Bowman GR, et al. The intrinsically disordered protein TgIST from *Toxoplasma gondii* inhibits STAT1 signaling by blocking cofactor recruitment. *Nat Commun.* 13 juill 2022;13(1):4047.
180. Behnke MS, Radke JB, Smith AT, Sullivan WJ, White MW. The transcription of bradyzoite genes in *Toxoplasma gondii* is controlled by autonomous promoter elements. *Mol Microbiol.* juin 2008;68(6):1502-18.
181. Mouveaux T, Oria G, Werkmeister E, Slomianny C, Fox BA, Bzik DJ, et al. Nuclear Glycolytic Enzyme Enolase of *Toxoplasma gondii* Functions as a Transcriptional Regulator. *PLoS One*

[Internet]. 25 août 2014 [cité 9 oct 2017];9(8). Disponible sur:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4143315/>

182. Behnke MS, Wootton JC, Lehmann MM, Radke JB, Lucas O, Nawas J, et al. Coordinated progression through two subtranscriptomes underlies the tachyzoite cycle of *Toxoplasma gondii*. *PLoS One*. 26 août 2010;5(8):e12354.
183. Llinás M, Deitsch KW, Voss TS. Plasmodium gene regulation: far more to factor in. *Trends Parasitol*. déc 2008;24(12):551-6.
184. Cleary MD, Singh U, Blader IJ, Brewer JL, Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii* Asexual Development: Identification of Developmentally Regulated Genes and Distinct Patterns of Gene Expression. *Eukaryotic Cell*. juin 2002;1(3):329-40.
185. Singh U, Brewer JL, Boothroyd JC. Genetic analysis of tachyzoite to bradyzoite differentiation mutants in *Toxoplasma gondii* reveals a hierarchy of gene induction. *Mol Microbiol*. mai 2002;44(3):721-33.
186. Xue S. A single-parasite transcriptional landscape of asexual development in *Toxoplasma gondii*. *Elife* 2019; 9, e54129. <https://doi.org/10.7554/eLife.54129>
187. Xue Y, Theisen TC, Rastogi S, Ferrel A, Quake SR, Boothroyd JC. A single-parasite transcriptional atlas of *Toxoplasma Gondii* reveals novel control of antigen expression. *Elife*. 17 févr 2020;9:e54129.
188. Balaji S, Babu MM, Iyer LM, Aravind L. Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(13):3994-4006.
189. Templeton TJ, Lancto CA, Vigdorovich V, Liu C, London NR, Hadsall KZ, et al. The *Cryptosporidium* oocyst wall protein is a member of a multigene family and has a homolog in *Toxoplasma*. *Infect Immun*. févr 2004;72(2):980-7.
190. Iyer LM, Anantharaman V, Wolf MY, Aravind L. Comparative genomics of transcription factors and chromatin proteins in parasitic protists and other eukaryotes. *Int J Parasitol*. janv 2008;38(1):1-31.
191. Magnani E, Sjölander K, Hake S. From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. *Plant Cell*. sept 2004;16(9):2265-77.
192. Kennedy K, Crisafulli EM, Ralph SA. Delayed Death by Plastid Inhibition in Apicomplexan Parasites. *Trends Parasitol*. oct 2019;35(10):747-59.
193. Aravind L, Galperin MY, Koonin EV. The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. *Trends Biochem Sci*. avr 1998;23(4):127-9.
194. Wang J, Dixon SE, Ting LM, Liu TK, Jeffers V, Croken MM, et al. Lysine acetyltransferase GCN5b interacts with AP2 factors and is required for *Toxoplasma gondii* proliferation. *PLoS Pathog*. janv 2014;10(1):e1003830.

195. Saksouk N, Bhatti MM, Kieffer S, Smith AT, Musset K, Garin J, et al. Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Cell Biol*. déc 2005;25(23):10301-14.
196. Waldman BS, Schwarz D, Wadsworth MH, Saeij JP, Shalek AK, Lourido S. Identification of a Master Regulator of Differentiation in *Toxoplasma*. *Cell*. 23 janv 2020;180(2):359-372.e16.
197. Fritz HM, Buchholz KR, Chen X, Durbin-Johnson B, Rocke DM, Conrad PA, et al. Transcriptomic analysis of *Toxoplasma* development reveals many novel functions and structures specific to sporozoites and oocysts. *PLoS One*. 2012;7(2):e29998.
198. Khorasanizadeh S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*. 23 janv 2004;116(2):259-72.
199. La différence entre des objets et des termes similaires. [Internet]. [cité 28 sept 2023]. Différence entre la chromatine et le nucléosome / Science. Disponible sur: <https://fr.differkinome.com/articles/science/difference-between-chromatin-and-nucleosome.html>
200. Gajria B, Bahl A, Brestelli J, Dommer J, Fischer S, Gao X, et al. ToxoDB: an integrated *Toxoplasma gondii* database resource. *Nucleic Acids Res*. janv 2008;36(Database issue):D553-556.
201. Kissinger JC, Gajria B, Li L, Paulsen IT, Roos DS. ToxoDB: accessing the *Toxoplasma gondii* genome. *Nucleic Acids Res*. 1 janv 2003;31(1):234-6.
202. Nardelli SC, Che FY, Silmon de Monerri NC, Xiao H, Nieves E, Madrid-Aliste C, et al. The histone code of *Toxoplasma gondii* comprises conserved and unique posttranslational modifications. *mBio*. 10 déc 2013;4(6):e00922-00913.
203. Hanover JA. Epigenetics gets sweeter: O-GlcNAc joins the « histone code ». *Chem Biol*. 22 déc 2010;17(12):1272-4.
204. Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, et al. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell*. 16 sept 2011;146(6):1016-28.
205. Xie Z, Dai J, Dai L, Tan M, Cheng Z, Wu Y, et al. Lysine succinylation and lysine malonylation in histones. *Mol Cell Proteomics*. mai 2012;11(5):100-7.
206. Severo V, Souza R, Vitorino F, Cunha J, Ávila A, Arrizabalaga G, et al. Previously Unidentified Histone H1-Like Protein Is Involved in Cell Division and Ribosome Biosynthesis in *Toxoplasma gondii*. *mSphere*. 21 déc 2022;7(6):e0040322.
207. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 6 janv 2000;403(6765):41-5.
208. Jeffers V, Sullivan WJ. Lysine acetylation is widespread on proteins of diverse function and localization in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell*. juin 2012;11(6):735-42.

209. Gissot M, Kelly KA, Ajioka JW, Greally JM, Kim K. Epigenomic modifications predict active promoters and gene structure in *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* juin 2007;3(6):e77.
210. Bouchut A, Chawla AR, Jeffers V, Hudmon A, Sullivan WJ. Proteome-wide lysine acetylation in cortical astrocytes and alterations that occur during infection with brain parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS One.* 2015;10(3):e0117966.
211. Dixon SE, Stilger KL, Elias EV, Naguleswaran A, Sullivan WJ. A decade of epigenetic research in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* sept 2010;173(1):1-9.
212. Bhatti MM, Livingston M, Mullapudi N, Sullivan WJ. Pair of unusual GCN5 histone acetyltransferases and ADA2 homologues in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell.* janv 2006;5(1):62-76.
213. Naguleswaran A, Elias EV, McClintick J, Edenberg HJ, Sullivan WJ. *Toxoplasma gondii* lysine acetyltransferase GCN5-A functions in the cellular response to alkaline stress and expression of cyst genes. *PLoS Pathog.* 16 déc 2010;6(12):e1001232.
214. Saksouk N, Bhatti MM, Kieffer S, Smith AT, Musset K, Garin J, et al. Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Cell Biol.* déc 2005;25(23):10301-14.
215. Harris MT, Jeffers V, Martynowicz J, True JD, Mosley AL, Sullivan WJ. A novel GCN5b lysine acetyltransferase complex associates with distinct transcription factors in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* sept 2019;232:111203.
216. Avvakumov N, Côté J. Functions of myst family histone acetyltransferases and their link to disease. *Subcell Biochem.* 2007;41:295-317.
217. Dubey A, Lee J, Kwon S, Lee YH, Jeon J. A MYST family histone acetyltransferase, MoSAS3, is required for development and pathogenicity in the rice blast fungus. *Mol Plant Pathol.* nov 2019;20(11):1491-505.
218. Smith AT, Tucker-Samaras SD, Fairlamb AH, Sullivan WJ. MYST family histone acetyltransferases in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell.* déc 2005;4(12):2057-65.
219. Vonlaufen N, Naguleswaran A, Coppens I, Sullivan WJ. MYST family lysine acetyltransferase facilitates ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase-mediated DNA damage response in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 9 avr 2010;285(15):11154-61.
220. Aj de R, Ah van G, Hn C, S K, Ab van K. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *The Biochemical journal* [Internet]. 15 mars 2003 [cité 29 sept 2023];370(Pt 3). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12429021/>
221. Sidik SM, Huet D, Ganesan SM, Huynh MH, Wang T, Nasamu AS, et al. A Genome-wide CRISPR Screen in *Toxoplasma* Identifies Essential Apicomplexan Genes. *Cell.* 8 sept 2016;166(6):1423-1435.e12.
222. Yakubu RR, Silmon de Monerri NC, Nieves E, Kim K, Weiss LM. Comparative Monomethylarginine Proteomics Suggests that Protein Arginine Methyltransferase 1 (PRMT1)

- is a Significant Contributor to Arginine Monomethylation in *Toxoplasma gondii*. *Mol Cell Proteomics*. avr 2017;16(4):567-80.
223. Sautel CF, Cannella D, Bastien O, Kieffer S, Aldebert D, Garin J, et al. SET8-mediated methylations of histone H4 lysine 20 mark silent heterochromatic domains in apicomplexan genomes. *Mol Cell Biol*. août 2007;27(16):5711-24.
224. Wu J, Cui N, Wang R, Li J, Wong J. A role for CARM1-mediated histone H3 arginine methylation in protecting histone acetylation by releasing corepressors from chromatin. *PLoS One*. 2012;7(6):e34692.
225. Tachibana M, Sugimoto K, Fukushima T, Shinkai Y. Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J Biol Chem*. 6 juill 2001;276(27):25309-17.
226. Fnu S, Williamson EA, De Haro LP, Brenneman M, Wray J, Shaheen M, et al. Methylation of histone H3 lysine 36 enhances DNA repair by nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11 janv 2011;108(2):540-5.
227. Dorn ES, Cook JG. Nucleosomes in the neighborhood: new roles for chromatin modifications in replication origin control. *Epigenetics*. mai 2011;6(5):552-9.
228. El Bissati K, Suvorova ES, Xiao H, Lucas O, Upadhy R, Ma Y, et al. *Toxoplasma gondii* Arginine Methyltransferase 1 (PRMT1) Is Necessary for Centrosome Dynamics during Tachyzoite Cell Division. *mBio*. 2 févr 2016;7(1):e02094-15.
229. Xiao H, El Bissati K, Verdier-Pinard P, Burd B, Zhang H, Kim K, et al. Post-translational modifications to *Toxoplasma gondii* alpha- and beta-tubulins include novel C-terminal methylation. *J Proteome Res*. janv 2010;9(1):359-72.
230. Brooks CF, Francia ME, Gissot M, Croken MM, Kim K, Striepen B. *Toxoplasma gondii* sequesters centromeres to a specific nuclear region throughout the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 mars 2011;108(9):3767-72.
231. Modifications at K31 on the lateral surface of histone H4 contribute to genome structure and expression in apicomplexan parasites - PubMed [Internet]. [cité 28 sept 2023]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29101771/>
232. Silmon de Monerri NC, Yakubu RR, Chen AL, Bradley PJ, Nieves E, Weiss LM, et al. The Ubiquitin Proteome of *Toxoplasma gondii* Reveals Roles for Protein Ubiquitination in Cell Cycle Transitions. *Cell Host Microbe*. 11 nov 2015;18(5):621-33.
233. Trelle MB, Salcedo-Amaya AM, Cohen AM, Stunnenberg HG, Jensen ON. Global histone analysis by mass spectrometry reveals a high content of acetylated lysine residues in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Proteome Res*. juill 2009;8(7):3439-50.
234. Issar N, Roux E, Mattei D, Scherf A. Identification of a novel post-translational modification in *Plasmodium falciparum*: protein sumoylation in different cellular compartments. *Cell Microbiol*. oct 2008;10(10):1999-2011.

235. The small ubiquitin-like modifier (SUMO)-conjugating system of *Toxoplasma gondii* - PubMed [Internet]. [cité 28 sept 2023]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18761012/>
236. Jiang T, Zhou X, Taghizadeh K, Dong M, Dedon PC. N-formylation of lysine in histone proteins as a secondary modification arising from oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2 janv 2007;104(1):60-5.
237. Chen Y, Sprung R, Tang Y, Ball H, Sangras B, Kim SC, et al. Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones. *Mol Cell Proteomics*. mai 2007;6(5):812-9.
238. Malik HS, Henikoff S. Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol*. nov 2003;10(11):882-91.
239. Talbert PB, Henikoff S. Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. avr 2010;11(4):264-75.
240. Banaszynski LA, Allis CD, Lewis PW. Histone variants in metazoan development. *Dev Cell*. 16 nov 2010;19(5):662-74.
241. Nardelli SC, Silmon de Monerri NC, Vanagas L, Wang X, Tampaki Z, Sullivan WJ, et al. Genome-wide localization of histone variants in *Toxoplasma gondii* implicates variant exchange in stage-specific gene expression. *BMC Genomics*. 14 févr 2022;23(1):128.
242. Dalmaso MC, Onyango DO, Naguleswaran A, Sullivan WJ, Angel SO. *Toxoplasma* H2A variants reveal novel insights into nucleosome composition and functions for this histone family. *J Mol Biol*. 11 sept 2009;392(1):33-47.
243. Sullivan WJ, Hakimi MA. Histone mediated gene activation in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. août 2006;148(2):109-16.
244. Bougdour A, Maubon D, Baldacci P, Ortet P, Bastien O, Bouillon A, et al. Drug inhibition of HDAC3 and epigenetic control of differentiation in Apicomplexa parasites. *J Exp Med*. 13 avr 2009;206(4):953-66.
245. Sullivan WJ, Jeffers V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol Rev*. mai 2012;36(3):717-33.
246. Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. juill 1998;28(7):1019-24.
247. Weiss LM, Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci*. 1 avr 2000;5:D391-405.
248. Sinai AP, Watts EA, Dhara A, Murphy RD, Gentry MS, Patwardhan A. Reexamining Chronic *Toxoplasma gondii* Infection: Surprising Activity for a « Dormant » Parasite. *Curr Clin Microbiol Rep*. déc 2016;3(4):175-85.
249. Watts E, Zhao Y, Dhara A, Eller B, Patwardhan A, Sinai AP. Novel Approaches Reveal that *Toxoplasma gondii* Bradyzoites within Tissue Cysts Are Dynamic and Replicating Entities In Vivo. *mBio*. 8 sept 2015;6(5):e01155-01115.

250. Wang T, Gao JM, Yi SQ, Geng GQ, Gao XJ, Shen JL, et al. *Toxoplasma gondii* infection in the peritoneal macrophages of rats treated with glucocorticoids. *Parasitol Res.* janv 2014;113(1):351-8.
251. Zhang YW, Halonen SK, Ma YF, Wittner M, Weiss LM. Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. *Infect Immun.* janv 2001;69(1):501-7.
252. Ferguson DJP. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int J Parasitol.* 9 mars 2004;34(3):347-60.
253. Tomita T, Bzik DJ, Ma YF, Fox BA, Markillie LM, Taylor RC, et al. The *Toxoplasma gondii* cyst wall protein CST1 is critical for cyst wall integrity and promotes bradyzoite persistence. *PLoS Pathog.* 2013;9(12):e1003823.
254. Tu V, Tomita T, Sugi T, Mayoral J, Han B, Yakubu RR, et al. The *Toxoplasma gondii* Cyst Wall Interactome. *mBio.* 4 févr 2020;11(1):e02699-19.
255. Tu V, Mayoral J, Sugi T, Tomita T, Han B, Ma YF, et al. Enrichment and Proteomic Characterization of the Cyst Wall from In Vitro *Toxoplasma gondii* Cysts. *mBio.* 30 avr 2019;10(2):e00469-19.
256. Lane A, Soete M, Dubremetz JF, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: appearance of specific markers during the development of tissue cysts in vitro. *Parasitol Res.* 1996;82(4):340-6.
257. Lemgruber L, Lupetti P, Martins-Duarte ES, De Souza W, Vommaro RC. The organization of the wall filaments and characterization of the matrix structures of *Toxoplasma gondii* cyst form. *Cell Microbiol.* déc 2011;13(12):1920-32.
258. Parmley SF, Yang S, Harth G, Sibley LD, Sucharczuk A, Remington JS. Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. *Mol Biochem Parasitol.* août 1994;66(2):283-96.
259. Parmley S, Slifer T, Araujo F. Protective effects of immunization with a recombinant cyst antigen in mouse models of infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J Infect Dis.* 15 févr 2002;185 Suppl 1:S90-95.
260. Buchholz KR, Bowyer PW, Boothroyd JC. Bradyzoite pseudokinase 1 is crucial for efficient oral infectivity of the *Toxoplasma gondii* tissue cyst. *Eukaryot Cell.* mars 2013;12(3):399-410.
261. Craver MPJ, Rooney PJ, Knoll LJ. Isolation of *Toxoplasma gondii* development mutants identifies a potential proteophosphoglycan that enhances cyst wall formation. *Mol Biochem Parasitol.* févr 2010;169(2):120-3.
262. Sugi T, Tu V, Ma Y, Tomita T, Weiss LM. *Toxoplasma gondii* Requires Glycogen Phosphorylase for Balancing Amylopectin Storage and for Efficient Production of Brain Cysts. *mBio.* 29 août 2017;8(4):e01289-17.
263. Uboldi AD, McCoy JM, Blume M, Gerlic M, Ferguson DJP, Dagley LF, et al. Regulation of Starch Stores by a Ca²⁺-Dependent Protein Kinase Is Essential for Viable Cyst Development in *Toxoplasma gondii*. *Cell Host Microbe.* 9 déc 2015;18(6):670-81.

264. Lyu C, Yang X, Yang J, Hou L, Zhou Y, Zhao J, et al. Role of amylopectin synthesis in *Toxoplasma gondii* and its implication in vaccine development against toxoplasmosis. *Open Biol.* juin 2021;11(6):200384.
265. Denton H, Roberts CW, Alexander J, Thong KW, Coombs GH. Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol Lett.* 15 mars 1996;137(1):103-8.
266. Shukla A, Olszewski KL, Llinás M, Rommereim LM, Fox BA, Bzik DJ, et al. Glycolysis is important for optimal asexual growth and formation of mature tissue cysts by *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* oct 2018;48(12):955-68.
267. Abdelbaset AE, Fox BA, Karram MH, Abd Ellah MR, Bzik DJ, Igarashi M. Lactate dehydrogenase in *Toxoplasma gondii* controls virulence, bradyzoite differentiation, and chronic infection. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173745.
268. Dzierszinski F, Mortuaire M, Dendouga N, Popescu O, Tomavo S. Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Mol Biol.* 22 juin 2001;309(5):1017-27.
269. Di Cristina M, Dou Z, Lunghi M, Kannan G, Huynh MH, McGovern OL, et al. *Toxoplasma* depends on lysosomal consumption of autophagosomes for persistent infection. *Nat Microbiol.* 19 juin 2017;2:17096.
270. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev.* avr 1998;11(2):267-99.
271. Mayoral J, Di Cristina M, Carruthers VB, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: Bradyzoite Differentiation In Vitro and In Vivo. *Methods Mol Biol.* 2020;2071:269-82.
272. Weiss LM, Ma YF, Takvorian PM, Tanowitz HB, Wittner M. Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response. *Infect Immun.* juill 1998;66(7):3295-302.
273. Fox BA, Gigley JP, Bzik DJ. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Int J Parasitol.* 9 mars 2004;34(3):323-31.
274. Yahiaoui B, Dzierszinski F, Bernigaud A, Slomianny C, Camus D, Tomavo S. Isolation and characterization of a subtractive library enriched for developmentally regulated transcripts expressed during encystation of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* 30 avr 1999;99(2):223-35.
275. Cerutti A, Blanchard N, Besteiro S. The Bradyzoite: A Key Developmental Stage for the Persistence and Pathogenesis of Toxoplasmosis. *Pathogens.* 21 mars 2020;9(3):234.
276. Bohne W, Heesemann J, Gross U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect Immun.* mai 1994;62(5):1761-7.

277. Tomavo S, Boothroyd JC. Interconnection between organellar functions, development and drug resistance in the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* nov 1995;25(11):1293-9.
278. Bohne W, Heesemann J, Gross U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infect Immun.* mars 1993;61(3):1141-5.
279. Ferreira-da-Silva M da F, Rodrigues RM, Andrade EF de, Carvalho L de, Gross U, Lüder CGK, et al. Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* mars 2009;104(2):196-200.
280. Swierzy IJ, Lüder CGK. Withdrawal of skeletal muscle cells from cell cycle progression triggers differentiation of *Toxoplasma gondii* towards the bradyzoite stage. *Cell Microbiol.* janv 2015;17(1):2-17.
281. Christiansen C, Maus D, Hoppenz E, Murillo-León M, Scholz J, Melerowicz F, et al. In vitro maturation of *Toxoplasma gondii* bradyzoites in human myotubes and their metabolomic characterization. *Nat Commun* 2022; 13, 1168. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28730-w>
282. Creuzet C, Robert F, Roisin MP, Van Tan H, Benes C, Dupouy-Camet J, et al. Neurons in primary culture are less efficiently infected by *Toxoplasma gondii* than glial cells. *Parasitol Res.* 1998;84(1):25-30.
283. Passeri E, Jones-Brando L, Bordón C, Sengupta S, Wilson AM, Primerano A, et al. Infection and characterization of *Toxoplasma gondii* in human induced neurons from patients with brain disorders and healthy controls. *Microbes Infect.* févr 2016;18(2):153-8.
284. Tanaka N, Ashour D, Dratz E, Halonen S. Use of human induced pluripotent stem cell-derived neurons as a model for Cerebral Toxoplasmosis. *Microbes Infect.* 2016;18(7-8):496-504.
285. Barbosa JL, Béla SR, Ricci MF, Noviello M de LM, Cartelle CT, Pinheiro BV, et al. Spontaneous *T. gondii* neuronal encystment induces structural neuritic network impairment associated with changes of tyrosine hydroxylase expression. *Neurosci Lett.* 23 janv 2020;718:134721.
286. Lüder CGK, Rahman T. Impact of the host on *Toxoplasma* stage differentiation. *Microb Cell.* 22 juin 2017;4(7):203-11.
287. Ihara F, Nishikawa Y. Starvation of low-density lipoprotein-derived cholesterol induces bradyzoite conversion in *Toxoplasma gondii*. *Parasit Vectors.* 29 mai 2014;7:248.
288. Weilhammer DR, Iavarone AT, Villegas EN, Brooks GA, Sinai AP, Sha WC. Host metabolism regulates growth and differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* sept 2012;42(10):947-59.
289. Swierzy IJ, Händel U, Kaefer A, Jarek M, Scharfe M, Schlüter D, et al. Divergent co-transcriptomes of different host cells infected with *Toxoplasma gondii* reveal cell type-specific host-parasite interactions. *Sci Rep.* 3 août 2017;7(1):7229.
290. Parmley SF, Weiss LM, Yang S. Cloning of a bradyzoite-specific gene of *Toxoplasma gondii* encoding a cytoplasmic antigen. *Mol Biochem Parasitol.* juill 1995;73(1-2):253-7.

291. Yang S, Parmley SF. A bradyzoite stage-specifically expressed gene of *Toxoplasma gondii* encodes a polypeptide homologous to lactate dehydrogenase. *Mol Biochem Parasitol.* juill 1995;73(1-2):291-4.
292. Manger ID, Hehl A, Parmley S, Sibley LD, Marra M, Hillier L, et al. Expressed sequence tag analysis of the bradyzoite stage of *Toxoplasma gondii*: identification of developmentally regulated genes. *Infect Immun.* avr 1998;66(4):1632-7.
293. Holpert M, Lüder CG, Gross U, Bohne W. Bradyzoite-specific expression of a P-type ATPase in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* févr 2001;112(2):293-6.
294. Tomavo S, Fortier B, Soete M, Ansel C, Camus D, Dubremetz JF. Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* oct 1991;59(10):3750-3.
295. Pittman KJ, Aliota MT, Knoll LJ. Dual transcriptional profiling of mice and *Toxoplasma gondii* during acute and chronic infection. *BMC Genomics.* 20 sept 2014;15(1):806.
296. Garfoot AL, Wilson GM, Coon JJ, Knoll LJ. Proteomic and transcriptomic analyses of early and late-chronic *Toxoplasma gondii* infection shows novel and stage specific transcripts. *BMC Genomics.* 14 nov 2019;20(1):859.
297. Buchholz KR, Fritz HM, Chen X, Durbin-Johnson B, Rocke DM, Ferguson DJ, et al. Identification of tissue cyst wall components by transcriptome analysis of in vivo and in vitro *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *Eukaryot Cell.* déc 2011;10(12):1637-47.
298. Radke JB, Worth D, Hong D, Huang S, Sullivan WJ, Wilson EH, et al. Transcriptional repression by ApiAP2 factors is central to chronic toxoplasmosis. *PLoS Pathog.* mai 2018;14(5):e1007035.
299. White MW, Radke JR, Radke JB. *Toxoplasma* development - turn the switch on or off? *Cell Microbiol.* avr 2014;16(4):466-72.
300. Hong DP, Radke JB, White MW. Opposing Transcriptional Mechanisms Regulate *Toxoplasma* Development. *mSphere.* 2017;2(1):e00347-16.
301. Walker R, Gissot M, Croken MM, Huot L, Hot D, Kim K, et al. The *Toxoplasma* nuclear factor TgAP2XI-4 controls bradyzoite gene expression and cyst formation. *Mol Microbiol.* févr 2013;87(3):641-55.
302. Radke JB, Lucas O, De Silva EK, Ma Y, Sullivan WJ, Weiss LM, et al. ApiAP2 transcription factor restricts development of the *Toxoplasma* tissue cyst. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23 avr 2013;110(17):6871-6.
303. Huang S, Holmes MJ, Radke JB, Hong DP, Liu TK, White MW, et al. *Toxoplasma gondii* AP2IX-4 Regulates Gene Expression during Bradyzoite Development. *mSphere.* 2017;2(2):e00054-17.
304. Olguin-Lamas A, Madec E, Hovasse A, Werkmeister E, Callebaut I, Slomianny C, et al. A Novel *Toxoplasma gondii* Nuclear Factor TgNF3 Is a Dynamic Chromatin-Associated Component, Modulator of Nucleolar Architecture and Parasite Virulence. *PLoS Pathog* [Internet]. 31 mars 2011 [cité 9 oct 2017];7(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3068996/>

305. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*. nov 2000;6(5):1099-108.
306. Wek RC, Jiang HY, Anthony TG. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans*. févr 2006;34(Pt 1):7-11.
307. Holmes MJ, Augusto L da S, Zhang M, Wek RC, Sullivan WJ. Translational Control in the Latency of Apicomplexan Parasites. *Trends Parasitol*. déc 2017;33(12):947-60.
308. Sullivan WJ, Narasimhan J, Bhatti MM, Wek RC. Parasite-specific eIF2 (eukaryotic initiation factor-2) kinase required for stress-induced translation control. *Biochem J*. 1 juin 2004;380(Pt 2):523-31.
309. Joyce BR, Tampaki Z, Kim K, Wek RC, Sullivan WJ. The unfolded protein response in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* features translational and transcriptional control. *Eukaryot Cell*. juill 2013;12(7):979-89.
310. Hinnebusch AG, Ivanov IP, Sonenberg N. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science*. 17 juin 2016;352(6292):1413-6.
311. Licon MH, Giuliano CJ, Chakladar S, Shallberg L, Waldman BS, Hunter CA, et al. A positive feedback loop controls *Toxoplasma* chronic differentiation [Internet]. *bioRxiv*; 2022 [cité 20 avr 2023]. p. 2022.04.06.487076. Disponible sur: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.04.06.487076v1>
312. Radke JR, Striepen B, Guerini MN, Jerome ME, Roos DS, White MW. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. juill 2001;115(2):165-75.
313. Croken MM, Ma Y, Markillie LM, Taylor RC, Orr G, Weiss LM, et al. Distinct strains of *Toxoplasma gondii* feature divergent transcriptomes regardless of developmental stage. *PLoS One*. 2014;9(11):e111297.
314. Croken MM, Qiu W, White MW, Kim K. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of *Toxoplasma gondii* expression datasets links cell cycle progression and the bradyzoite developmental program. *BMC Genomics*. 24 juin 2014;15(1):515.
315. Radke JR, Guerini MN, Jerome M, White MW. A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. oct 2003;131(2):119-27.
316. Boyle JP, Rajasekar B, Saeij JPJ, Ajioka JW, Berriman M, Paulsen I, et al. Just one cross appears capable of dramatically altering the population biology of a eukaryotic pathogen like *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5 juill 2006;103(27):10514-9.
317. Kim K. The Epigenome, Cell Cycle, and Development in *Toxoplasma*. *Annu Rev Microbiol*. 8 sept 2018;72:479-99.
318. Flegr J, Kuba R. The Relation of *Toxoplasma* Infection and Sexual Attraction to Fear, Danger, Pain, and Submissiveness. *Evol Psychol*. 1 sept 2016;14(3):1474704916659746.

319. EBSCOhost | 154342855 | Evaluation of S100B Protein in Patients with Schizophrenia with Seropositive and Seronegative Toxoplasma. [Internet]. [cité 12 déc 2022]. Disponible sur: <https://web.s.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=13059319&AN=154342855&h=n7c%2fCRUKW3L%2b6H6nmlyCrIssC%2f5I7RnC97LB3bGkpxdIBE%2fUszSEOPsSTckDO5PpFPoYD89s6uqrcfRaeS7dwQ%3d%3d&crl=c&resultNs=AdminWebAuth&resultLocal=ErrCrINotAuth&crlhashurl=login.aspx%3fdirect%3dtrue%26profile%3dehost%26scope%3dsite%26authtype%3dcrawler%26jrnl%3d13059319%26AN%3d154342855>
320. Oncu-Oner T, Can S. Meta-analysis of the relationship between *Toxoplasma gondii* and schizophrenia. *Ann Parasitol.* 2022;68(1):103-10.
321. Tenter AM. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* mars 2009;104(2):364-9.
322. Gissot M, Kim K, Schaap D, Ajioka JW. New eukaryotic systematics: A phylogenetic perspective of developmental gene expression in the Apicomplexa. *International Journal for Parasitology.* 15 janv 2009;39(2):145-51.
323. Bouchut A, Rotili D, Pierrot C, Valente S, Lafitte S, Schultz J, et al. Identification of novel quinazoline derivatives as potent antiplasmodial agents. *Eur J Med Chem.* 1 janv 2019;161:277-91.
324. Benarroch EE. Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin Proc.* oct 2005;80(10):1326-38.
325. Weiss LM, Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci.* 1 avr 2000;5:D391-405.
326. Antunes AV, Shahinas M, Swale C, Farhat DC, Ramakrishnan C, Bruley C, et al. In vitro production of cat-restricted *Toxoplasma* pre-sexual stages by epigenetic reprogramming [Internet]. *bioRxiv*; 2023 [cité 20 avr 2023]. p. 2023.01.16.524187. Disponible sur: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.01.16.524187v1>
327. Torres JA, Pasquarelli RR, Back PS, Moon AS, Bradley PJ. Identification and Molecular Dissection of IMC32, a Conserved *Toxoplasma* Inner Membrane Complex Protein That Is Essential for Parasite Replication. *mBio.* 16 févr 2021;12(1):e03622-20.
328. Vizcarra EA, Goerner AL, Ulu A, Hong DD, Bergersen KV, Talavera MA, et al. An ex vivo model of *Toxoplasma* recrudescence reveals developmental plasticity of the bradyzoite stage. *mBio.* 7 sept 2023;0(0):e01836-23.
329. Dzierszinski F, Nishi M, Ouko L, Roos DS. Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. *Eukaryot Cell.* août 2004;3(4):992-1003.
330. Ferguson DJ, Hutchison WM, Pettersen E. Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. An immunocytochemical and ultrastructural study. *Parasitol Res.* 1989;75(8):599-603.
331. Fu Y, Brown KM, Jones NG, Moreno SN, Sibley LD. *Toxoplasma* bradyzoites exhibit physiological plasticity of calcium and energy stores controlling motility and egress. *Elife.* 3 déc 2021;10:e73011.

332. Najm R, Ruivo MTG, Penarete-Vargas DM, Hamie M, Mouveaux T, Gissot M, et al. Invasion of *Toxoplasma gondii* bradyzoites: Molecular dissection of the moving junction proteins and effective vaccination targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 31 janv 2023;120(5):e2219533120.
333. Yue K, Qin M, Huang C, James Chou C, Jiang Y, Li X. Comparison of three zinc binding groups for HDAC inhibitors – A potency, selectivity and enzymatic kinetics study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 15 août 2022;70:128797.
334. Sanfelice RA, Rodrigues Bosqui L, da Silva SS, Miranda-Sapla MM, Aparecido Panagio L, Navarro IT, et al. Proliferation of *Toxoplasma gondii* (RH strain) is inhibited by the combination of pravastatin and simvastatin with low concentrations of conventional drugs used in toxoplasmosis. *Journal of Applied Biomedicine*. 1 févr 2018;16(1):29-33.
335. Wang Y, Sangaré LO, Paredes-Santos TC, Hassan MA, Krishnamurthy S, Furuta AM, et al. Genome-wide screens identify *Toxoplasma gondii* determinants of parasite fitness in IFN γ -activated murine macrophages. *Nat Commun*. 16 oct 2020;11(1):5258.