



HAL
open science

Etude des histones déacétylases (HDACs) de classes I et III du parasite plathelminthe *Schistosoma mansoni*

Florence Dubois

► **To cite this version:**

Florence Dubois. Etude des histones déacétylases (HDACs) de classes I et III du parasite plathelminthe *Schistosoma mansoni*. Biochimie [q-bio.BM]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2009. Français. NNT: . tel-00451179

HAL Id: tel-00451179

<https://theses.hal.science/tel-00451179>

Submitted on 29 Jan 2010

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

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

Université Lille 2
Université du Droit et de la Santé
Ecole Doctorale Biologie-Santé
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille
N°d'Ordre :

Thèse pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 2
Discipline Biologie Moléculaire et Parasitologie
Présentée et soutenue publiquement par

FLORENCE DUBOIS

le 17 Décembre 2009

**ÉTUDE DES HISTONES DEACETYLASES (HDACs) DE CLASSES I
ET III DU PARASITE PLATHELMINTE *SCHISTOSOMA MANSONI***

Devant le Jury composé de :

Président du Jury : **Professeur Monique CAPRON**

Rapporteurs : **Professeur Guillaume MITTA**
Docteur Jean-Paul RENAUD

Examineurs : **Docteur Christoph GRUNAU**
Docteur Dominique LEPRINCE
Docteur Raymond J. PIERCE

Inserm U547
« Schistosomiase, Paludisme et Inflammation »
Université Lille 2
Institut Pasteur de Lille

RESUME

La schistosomiase est la deuxième endémie parasitaire mondiale après le paludisme; 200 millions d'individus sont infectés à travers le monde et la morbidité reste élevée (environ 200 000 morts par an) malgré l'utilisation du praziquantel, seul médicament disponible. Cinq espèces de schistosomes infectent l'Homme dont celle que nous étudions, *Schistosoma mansoni*. Ce parasite possède un cycle de vie complexe, comportant 4 stades de développement morphologiquement distincts et 2 hôtes successifs, un hôte intermédiaire, le mollusque *Biomphalaria glabrata* et un hôte définitif, l'Homme. Afin de déterminer les mécanismes mis en jeu dans le contrôle du développement du schistosome et de caractériser des cibles potentielles de nouveaux agents chimiothérapeutiques, nous nous intéressons à certains acteurs impliqués dans la régulation génique, et plus particulièrement, les histones désacétylases, ou HDACs.

Les HDACs sont des enzymes bien conservées dans le règne du vivant. Elles contrôlent l'expression de 5 à 10% des gènes, majoritairement en réprimant la transcription *via* la désacétylation des histones. Elles sont réparties en 3 classes, les classes I et II sont composées d'enzymes dont le site catalytique comporte un ion zinc ; tandis que la classe III est composée des sirtuines, dépendantes du NAD⁺. Chez le parasite, une partie de nos études porte sur les 3 enzymes de classe I que nous avons identifiées et caractérisées au niveau moléculaire, SmHDAC1, 3 et 8. Ensuite nous avons réalisé une étude fonctionnelle de SmHDAC1 et mis en évidence sa capacité de répression de la transcription en système hétérologue. Puis nous nous sommes intéressés à l'inhibition de l'activité HDAC chez le parasite, grâce à l'utilisation de différents inhibiteurs des classes 1 et 2 des HDACs. Nous avons montré que des parasites cultivés en présence de trichostatine A (TSA) mouraient de manière dose-dépendante. Nous avons approfondi notre étude au niveau moléculaire et avons étudié la variation de l'acétylation des histones des parasites en présence de TSA et d'acide valproïque. Nous avons montré une augmentation de l'acétylation de manière dose-dépendante de l'histone H4. Le traitement par la TSA entraîne la mort de nombreux types cellulaires par apoptose et provoque une surexpression de certains gènes impliqués dans ce processus. Nous avons démontré que ce traitement induit l'apoptose chez des larves maintenues en culture, ainsi qu'une activation des Caspases 3/7. Ensuite, la caractérisation des ADNc des Caspases 3 et 7 nous a permis de montrer par RT-PCR en temps réel que les transcrits correspondants sont surproduits après traitement par la TSA, tandis que celle-ci n'a aucun effet sur la transcription de *SmHDAC1* et 3. Par la suite, nous avons corrélé cette augmentation avec le taux d'acétylation de H4 sur le promoteur de *caspase7*. Cette étude sera poursuivie à l'avenir par l'investigation de la relation structure/fonction des HDACs afin de développer des inhibiteurs spécifiques.

En parallèle, nous étudions une HDAC de classe III, SmSirt1, que nous avons identifiée et caractérisée. La présence d'une grande insertion dans son domaine catalytique présage des fonctions modifiées par rapport à ses orthologues chez d'autres espèces. Nous souhaitons nous focaliser sur les conséquences de cette insertion spécifique chez *S. mansoni*. En effet, elle semble être la cible de modifications post-traductionnelles potentielles (site de phosphorylation par PKB/Akt), que nous voulons mettre en évidence. De plus, l'une des fonctions de Sirt1 est l'interaction avec le facteur de transcription FoxO et la régulation de la voie de signalisation insuline-dépendante (impliquant PKB/Akt). Par ce biais FoxO et Sirt1 contrôlent le métabolisme, certains mécanismes de survie cellulaire et la longévité. Une modification de la fonction de SmSirt1 pourrait être à la base de la durée de vie anormalement longue de *S. mansoni*. Nous avons donc également réalisé la caractérisation moléculaire de SmFoxO, afin de mettre en évidence son interaction avec Sirt1 ainsi que l'implication de cette interaction dans le contrôle de la transcription de gènes cibles. Par la suite nous étudierons le rôle de Sirt1 et FoxO dans la régulation de la signalisation insuline dépendante sur des parasites en culture.

SUMMARY

Schistosomes are platyhelminth parasites that infect 200 million people and cause the death of 200,000 people each year throughout the world. Currently one drug, praziquantel, is used against all species of schistosomes, but resistant strains have been isolated in endemic areas as well as in laboratory studies. The need to find new drugs and new therapies is therefore urgent. Enzymes involved in gene regulation are promising targets for new drugs because of their essential role in the cell. We have targeted the enzymes responsible for histone deacetylation, the histone deacetylases (HDACs) that are generally involved in repressing transcription. These enzymes are already studied as potential therapeutic targets in cancer and parasitic diseases such as paludism. They form a family highly conserved throughout evolution that is composed of four classes. Classes I, II and IV are HDACs that require an active site zinc ion, whereas the third class is made up of the sirtuins that are NAD⁺-dependent.

The first part of the work was focused on class I HDACs. To investigate the conservation of these enzymes in *Schistosoma mansoni*, we cloned and characterized three class I HDACs, orthologues of mammalian HDAC1, 3 and 8, and confirmed their identities by phylogenetic analysis. The identification of an HDAC8 orthologue shows that it is not vertebrate-specific as previously thought and insertions in its catalytic domain suggest specific enzymatic properties. SmHDAC1, 3, and 8 mRNAs are expressed at all schistosome life-cycle stages. SmHDAC1 represses transcriptional activity in a mammalian cell line and this activity is dependent on its catalytic activity since transcription is partially restored by treatment with an HDAC inhibitor (HDACi) trichostatin A (TSA) and a catalytic site mutant fails to repress transcription. In order to determine the extent and importance of histone acetylation in *S. mansoni*, we tested the effects of three HDACi on both larval and adult worms in culture. TSA, valproic acid (VPA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) inhibited global HDAC activity at all life-cycle stages. TSA and VPA, but not SAHA, cause mortality of schistosomula and adults, with TSA showing the most rapid effect. Moreover, TSA causes an increase in apoptosis in schistosomula shown by the TUNEL assay and an increase in caspase 3/7 activity. Both TSA and VPA are shown to cause an increase in general levels of protein acetylation in schistosomes; more particularly of histone 4 whereas histone 3 acetylation is less affected. In the case of TSA treatment this histone hyperacetylation is correlated with the increased expression of caspases 3 and 7 transcripts. Finally, quantitative chromatin immunoprecipitation shows that the proximal promoter region of the *S. mansoni* caspase 7 gene is hyperacetylated on histone H4 after TSA treatment.

The second part of the work focussed on class III HDACs, sirtuins. The first of these enzymes, Sir2, was discovered in yeast and 7 orthologs, Sirt1 to 7, have been described in humans. We cloned and characterized a Sirt1 ortholog from *S. mansoni* that contains an insertion in its catalytic domain that may modify its activity and exhibits a potential phosphorylation site for PKB/Akt kinases. Sir2 and its orthologs have a very important role in lifespan regulation. Indeed, in the yeast as well as in other organisms such as *C. elegans* or the mouse, they interact with the transcription factor "Forkhead-Box Others" (FoxO) to extend lifespan in response to caloric restriction and are implicated in the regulation of the insulin receptor-dependent pathway, which involves PKB/Akt, FoxO and Sirt1 and controls cell metabolism, survival mechanisms and lifespan. Some of *S. mansoni* particularities are a long lifespan (more than 30 years in human), high calorie consumption and extreme fertility (more than 300 eggs laid each day by *S. mansoni* female worms). Taken together these characteristics are paradoxical since, in other organisms, calorie restriction increases lifespan and reduces reproduction. In order to dissect the mechanisms involved in this dysregulation, we have also characterized SmFoxO. Transcripts of SmSirt1 and SmFoxO are differentially expressed in the various *S. mansoni* life-cycle stages, but the corresponding proteins interact positively to drive transcription in transfected mammalian cell lines. Future work will focus on the role of the insulin pathway on SmSirt1/SmFoxO dependent gene transcription *in vivo*.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier Madame le Professeur Monique Capron de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pendant ces 4 années et de présider ce jury de thèse, clôture de l'aventure.

Je remercie également les membres du jury qui ont accepté de consacrer de leur temps afin d'évaluer ce travail : Messieurs Guillaume Mitta et Jean-Paul Renaud pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs ainsi que Messieurs Dominique Leprince et Christoph Grunau en tant qu'examineurs.

Merci Raymond de m'avoir permis d'intégrer ton groupe. Ca n'a pas toujours été facile mais au cours de ces années tu as été présent, tu as su m'aider, me soutenir et me conseiller. Ta porte est toujours ouverte pour la moindre question, le moindre doute, tu es une des rares personnes à être continuellement disponible pour aider quiconque. Merci Raymond.

Un grand merci va directement à tous les membres de l'unité Inserm U547 qui ont pu contribuer de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Aux anciens et actuels du « bas » (et à nos cop's de repas), je tiens à vous inclure dans ce travail. C'est grâce à vous tous, vos avis, vos humeurs, vos joies, vos peines, vos coups de gueules, vos encouragements, aux bonbons qui piquent... que la vie de l'équipe est possible et que chacun peut chercher! Chacun à sa manière a été important pour moi au cours de ces 4 années passées au labo. Je vous souhaite une bonne continuation et un surplus de courage pour la suite.

Un merci particulier à Stéph, ma partenaire de bureau, de paillasse, de succès et d'échecs (bien trop nombreux) de manips, et maintenant une nouvelle aventure continue pour nous deux !!!

Je tiens à remercier mes amis, qui même absents du labo, sont présents dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci les gueux! Luciano Pavarotti c'est fini! Et merci à Mary, ma copine de galère à distance. Ca y est, on est toutes les deux au bout... Que nous réserve l'avenir???

Finalement je remercie mes parents, Pompom & Lucky, et mon Sow pour leur soutien et tous leurs encouragements au fur et à mesure des années. J'ai toujours pu compter sur vous, vous avez toujours été là pour moi... Je risque d'avoir encore besoin d'aide d'ici peu!!!!
Merci.

TABLE DES MATIERES

ABBREVIATIONS	3
CADRE DU TRAVAIL	5
INTRODUCTION	6
1. LES SCHISTOSOMES	6
1.1. GENERALITES	6
1.2. CYCLE DE VIE	9
1.3. MALADIE, TRAITEMENT ET VACCIN	10
1.4. L'APPROCHE DE L'EQUIPE POUR LA CARACTERISATION DE NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES	12
2. EPIGENETIQUE	13
2.1. GENERALITES	13
a. Structure de la chromatine	13
b. Etats de condensation de la chromatine et son remodelage	16
→ L'épigénétique	16
→ Variants d'histones	17
→ Les facteurs de remodelage	20
c. Différentes modifications de la chromatine	23
1. Méthylation de l'ADN	26
2. Méthylation des histones	27
3. Acétylation des histones	28
4. Les autres modifications de la chromatine	29
→ Phosphorylation	29
→ Ubiquitylation	30
→ SUMO	30
→ ADP ribosylation	30
→ Isomérisation des prolines	30
→ Biotinylation	30
2.2. ACETYLATION/ DESACETYLATION : UNE BALANCE ESSENTIELLE	31
a. Les <i>Histones Acetyl Transferases</i>	31
1. La famille <i>GCN5-related N-Acetyl Transferase (GNAT)</i>	32
2. La famille <i>CBP/p300</i>	34
3. Les autres familles de <i>HATs</i>	35
→ MYST	35
→ RTT109	36
→ TAFII250	36
→ SRC	36
→ ATF-2	37
b. Les <i>Histones Deacetylases</i>	37
1. <i>Phylogénie des HDACs</i>	38
2. <i>HDACs Zn²⁺-dépendantes</i>	39
→ Mode d'action	39
→ Classe I	40
→ Classe II	42

→ Classe IV	43
→ Cancer et développement d'inhibiteurs	44
3. <i>HDACs NAD⁺-dépendantes, Classe III</i>	47
OBJECTIFS DE L'ETUDE	53
RESULTATS : Les enzymes SmHDACs : Caractérisation de trois SmHDACs de classe I chez <i>Schistosoma mansoni</i> et leurs implications dans la survie parasitaire	54
→ Présentation	54
→ Article 1 : <i>The class I histone deacetylases of the platyhelminth parasite Schistosoma mansoni</i>	56
→ Article 2 : <i>Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in Schistosoma mansoni</i>	65
→ Discussion	79
RESULTATS : La HDAC de classe III SmSirt1 et le facteur de transcription SmFoxO : Interaction fonctionnelle chez <i>Schistosoma mansoni</i> .	82
→ Présentation	82
→ Article 3 : <i>Functional interaction of Sirtuin 1 and FoxO from Schistosoma mansoni</i>	85
→ Discussion	112
DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES GENERALES	116
▪ Conservation de la balance Acétylation/désacétylation des histones chez <i>Schistosoma mansoni</i> .	116
▪ Sirt1, FoxO et la longévité chez <i>Schistosoma mansoni</i> .	118
▪ Histones déacetylases et autres enzymes modifiant les histones comme cibles anti-schistosomiales ?	121
▪ Un projet pour le développement de nouvelles classes d'agents thérapeutiques contre les schistosomes...	123
BIBLIOGRAPHIE	125

ABREVIATIONS

28-GST : 28kDa Glutathion-S-transférase	Hdm : Histone demethylase
AcCoA : Acétyl Coenzyme-A	HMT : Histones MethylTransferases
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	HNF4 : Hepatocyte Nuclear Factor 4
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire	IGF : Insulin-like Growth Factor
ADNr : Acide DésoxyriboNucléique ribosomique	Ino1 : Inositol 1-phosphate synthase
ADP : Adénosine Bi-Phosphate	IR : Insulin Receptor
ARN : Acide RiboNucléique	IRS-1 : Insuline Receptor Substrate-1
ARNm : Acide RiboNucléique messenger	ISWI : Imitation of SWItch
Asf1 : Anti-silencing factor 1	JmjC : Jumonji – Cruciform
ATF : Activating Transcription Factor	JMJD2A : JuMonJi Domain-containing protein 2A
ATP : Adénosine Tri-Phosphate	JNK : c-Jun N-terminal Kinase
Bbd : Bar body deficient	KO : Knock-Out
bHLH : basic Helix-Loop-Helix	LSD1 : Lysine Specific Demethylase1
Bin1 : Bridging integrator 1	LysCoA : Lysine Coenzyme A
BRMS1 : Breast Cancer Metastasis Suppressor 1	MARTs : Mono-ADP-Ribosyl-Tranferases
bZip : basic Zipper DNA-binding domain	MBD : methyl-CpG-binding domain
C/H : Cys/His rich regions	MBP : Methyl CpG Binding Protein
CaMK : Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein Kinase	MEF2 : Myocyte Enhancer Factor 2
CARM1 : Coactivator-Associated arginine Methyltransferase 1	MLL : Myeloid/Lymphoid Leukemia
CBP : CREB- Binding Protein	MOF : MOZ-Related Factors
CED3 : CELL Death abnormality	MOZ : Monocytic Leukemia Zinc Finger Protein
CENP-A : Centromere Protein A	MPP : Mitochondrial-Matrix Processing Peptidase
CHD : Chromodomain Helicase Domain	MST1 : Macrophage STimulating 1
ChIP : Chromatin ImmunoPrecipitation	MTA : Metastasis-associated protein
CK-2 : Casein Kinase-2	MyoD : Myogenic differentiation
Cox-1 : Cyclooxygenase-1	MYST : MOZ Ybf2/Sas3 Sas2 TIP60
CREB : cAMP Response Element Binding Protein	NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
CREs : cAMP-Response Elements	N-CoR : Nuclear Receptor Co-Repressor
CST1 : <i>Caenorhabditis</i> STE20-like kinase family member	NES : Nuclear Export Sequence
DAF : abnormal DAuer Formation	NF-κB : Nuclear Factor-Kappa B
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole	NLS : Nuclear Localization Sequence
DIN-1 : Dhp1p-interacting protein 1	NSD1 : Nuclear receptor binding SET Domain protein 1
DNMT : DNA MethylTranferases	NuRD : Nucleosome RemoDelling
E2F1 : E2F transcription factor 1	PAD14 : Peptidyl Arginine Deiminase 4
ER : Estrogen Receptor	PARPs : Poly-ADP-Ribose-Polymerases
EZH2 : Enhancer of Zeste Homolog 2	PCAF : p300/CP Associated Factor
FAT : Factor AcetylTransferase	PDK1 : Pyruvate Deshydrogenase Kinase 1
FKH : ForKHead box	PEPCK : Phospho-Enol-Pyruvate Carboxy-Kinase
FOX : Forkhead/winged helix box gene	PHD : Plant HomeoDomain
GABA : Gamma Amino Butyric Acid	PI3K : Phosphatidyl-3 kinase
Gcn5 : General Control Nonderepressible 5	PIKK : Phosphatidylinositol-3-OH Kinase-related Kinase
GDH : Glutamate DeHydrogenase	PKB : Proteine Kinase B
GNAT : GCN5-related N-Acetyl Tranferase	PoMuc : Polymorphic Mucine
GR : Glucocorticoid Recetor	PP1 : Protéine Phosphatase 1
HAT : Histone AcetylTransferase	PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
HBO1 : HAT Bound to Original Recognition Complex	PR : Progesterone Receptor
Hda1 : Histone Deacetylase 1	PRMT : Protein Arginine MethylTransferase
HDACi : HDAC inhibitor	PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
HDAC : Histone Deacetylase	Q-ChIP : Quantitative-ChIP
	QKF : Querkopf
	RAR : Réinoic Acid Receptor

Rb : Rétinoblastome
RbAp : Retinoblastoma suppressor-Associated protein
RBP1 : Retinol Binding Protein 1
REST : transcriptional Repressor Element 1-Silencing Transcription factor
RIDs : LXXLL receptor interacting motifs
ROS : Reactive Oxygene Species
Rpd3 : Reduced Potassium Dependency 3
RTT109 : Regulation of Ty1 Transposition gene product 109
SAGA : Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase
SAHA : Hydroxamique Suberoylanilide
SANT : domaine à activité hélicase
SAP : Sin3-Associated Polypeptides
SET : Su(var) E(z) Trithorax
Sir2 : Silent Information Regulator 2
Sirt : Sirtuine
SMRT : Silencing Mediator for Retinoic Acid Thyroid Hormone Receptors

SOD : Superoxide Dismutase
SRC : Steroid Receptor Coactivator
SUMO : Small Ubiquitin-Related Modifiers
SWI/SNF : Mating-type Switching/ Sucrose Non Fermenting
TAF : TATA Binding Protein Associated Factor IID
TBL1 : Tansducin Bta-Like protein 1
TBLR : Tansducin Bta-Like protein 1 Related
TBP2 : Thioredoxine Binding Protein
TCF : T Cell Factor
Tip60 : HIV Tat-interacting protein of 60 kDa
TR : Récepteur aux Hormones Thyroïdiennes
TRAIL : TNF-related apoptosis inducing ligand
TSA : Trichostatine A
TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling
UAS : Upstream Activating Sequence
VPA : Acide Valproïque
YY1 : Yin and Yang 1

CADRE DU TRAVAIL

LABORATOIRE D'ACCUEIL

Ce travail de doctorat a été réalisé à l'Institut Pasteur de Lille, au sein de l'unité Inserm 547 « Schistosomiase, Paludisme et Inflammation » dirigée par Madame le Pr. Monique Capron. Il a été effectué sous la direction du Dr. Raymond Pierce.

L'étude de la relation hôte-parasite, plus particulièrement chez *Schistosoma mansoni*, a toujours été le fil conducteur de l'unité Inserm 547, ainsi que de l'unité Inserm 167 dont elle est issue. Une partie des travaux est centrée sur l'analyse des mécanismes effecteurs et régulateurs de l'immunité innée et adaptative dans le contexte de la schistosomiase, du paludisme et au cours de différentes pathologies inflammatoires et allergiques. Certains de ces travaux ont notamment conduit à l'élaboration d'une stratégie vaccinale contre la schistosomiase. Actuellement, la Sh28GST (Glutathion S-Transférase de 28 kDa de *S. haematobium*) constitue le candidat vaccin le plus encourageant et vient de franchir les essais cliniques de phase II.

En parallèle, les travaux de notre groupe sont orientés vers l'étude des bases moléculaires de la relation hôte-parasite et, principalement, des mécanismes impliqués dans la régulation et le contrôle de l'expression génique chez *S. mansoni*.

FINANCEMENTS

Ces trois années de thèse ont été cofinancées par le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur et par l'Université Lille 2 dans le cadre du monitorat.

INTRODUCTION

1. LES SCHISTOSOMES

1.1. GENERALITES

C'est en Egypte, vers 1852, que le Docteur Théodor Bilharz met en évidence pour la première fois la présence de vers au niveau des veines mésentériques et la relie aux œufs prélevés dans les urines de patients. C'est alors que fut mise en évidence la bilharziose, ou schistosomiase. Mais au travers de documents bien plus anciens (Papyrus de Kahum, 1900 avant JC), on relève déjà des descriptions de la maladie.

Cette pathologie est causée par l'infestation de l'hôte définitif vertébré par un ver schistosome dont la dernière classification zoologique basée sur des critères morphologiques et zoologiques place les schistosomes à la position suivante :


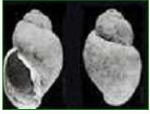


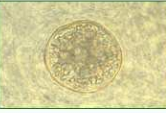

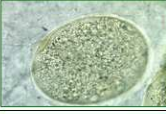
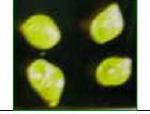


- Embranchement des plathelminthes : vers plat non métamérisés segmentés
- Classe des trématodes : présence de 2 ventouses (orales et ab-orales)
- Sous-classe des digènes : 2 hôtes successifs au cours du cycle de vie
- Super-ordre des protostomiens : la bouche se forme avant l'anus lors du développement embryonnaire
- Ordre des distomes : ventouses rapprochées, court tractus digestif
- Sous-ordre des *Schistosomatidae* : présence de sexes séparés
- Famille des segmentés : présence d'un stade larvaire libre
- Genre *Schistosoma*

Les schistosomes sont à la base de l'arbre phylogénétique et sont donc des organismes primitifs selon cette classification. Cependant des études phylogéniques prenant en compte les données moléculaires et notamment l'ARN ribosomal 18S [Aguinaldo et al, 1997] ou encore les gènes homéotiques [de Rosa et al, 1999 ; Balavoine et al, 2002], ont remis en cause cette organisation et ont permis de réorganiser les bilatéraux et le super-ordre des protostomiens. En effet 2 groupes sont nés de cette classification [Adoutte et al, 2000] : les ecdysozoaires (phase(s) de mue durant leur développement) et les lophotrochozoaires (développement continu). Dans cette classification, les schistosomes appartiennent aux lophotrochozoaires, ce qui ne fait plus d'eux des organismes ancestraux. Au sein du genre *Schistosoma*, il existe 19 espèces de schistosomes, classées selon différents critères morphologiques, parasitologiques, phylogénétiques et pathologiques. Parmi les différentes espèces de schistosomes infestant de nombreux hôtes vertébrés, seules 5 espèces contaminent l'Homme (**Figure 1**) :

- *Schistosoma haematobium*

- *Schistosoma intercalatum*
- *Schistosoma japonicum*
- *Schistosoma mekongi*
- *Schistosoma mansoni*

Les différentes espèces ne sont pas réparties dans les mêmes zones géographiques (**Figure 2**), c'est la spécificité de l'hôte intermédiaire qui régit cette distribution (**Figure 1**).

Espèce de schistosome	Photographie de l'oeuf	Genre de l'hôte intermédiaire	Photographie de l'hôte intermédiaire	Figure 1 : Parasites schistosomes humains, œufs et leurs hôtes intermédiaires. D'après Gryseels et al, 2006 ; Ohmae H. et al, 2004 ; Jourdane J. et al, 2001 ; Wellcome trust, 1998. Œufs : <i>S. haematobium</i> : 150X60 µm, ovoïde éperon terminal réduit. <i>S. mansoni</i> : 140X60 µm, éperon latéral. <i>S. japonicum</i> : 70X50 µm, ovale éperon latéral peu visible. <i>S. mekongi</i> : 60X40µm, ovale éperon latéral peu visible. <i>S. intercalatum</i> : 200X65 µm, allongé éperon terminal.
<i>Schistosoma haematobium</i>		<i>Bulinus</i>		
<i>Schistosoma mansoni</i>		<i>Biomphalaria</i>		
<i>Schistosoma japonicum</i>		<i>Oncomelania</i>		
<i>Schistosoma mekongi</i>		<i>Neotricula</i>		
<i>Schistosoma intercalatum</i>		<i>Bulinus</i>		

Les schistosomes sont répartis sur 3 continents : Asie, Afrique et Amérique du sud ; et répandus à travers 74 pays différents. *S. haematobium* est endémique en Afrique et au Moyen Orient. *S. mansoni* est présent dans 46 pays à travers l'Afrique sub-saharienne, le Moyen Orient, l'Amérique du sud et les Caraïbes. *S. intercalatum* touche le Zaïre, le Gabon et le Cameroun ; *S. japonicum* est principalement retrouvé en Asie du sud-est (Chine) et dans certaines régions du Pacifique Ouest (Philippines, Indonésie). L'aire de distribution de l'espèce *S. mekongi* est particulièrement restreinte car elle n'est retrouvée que dans la vallée du Mékong (Laos, Cambodge).

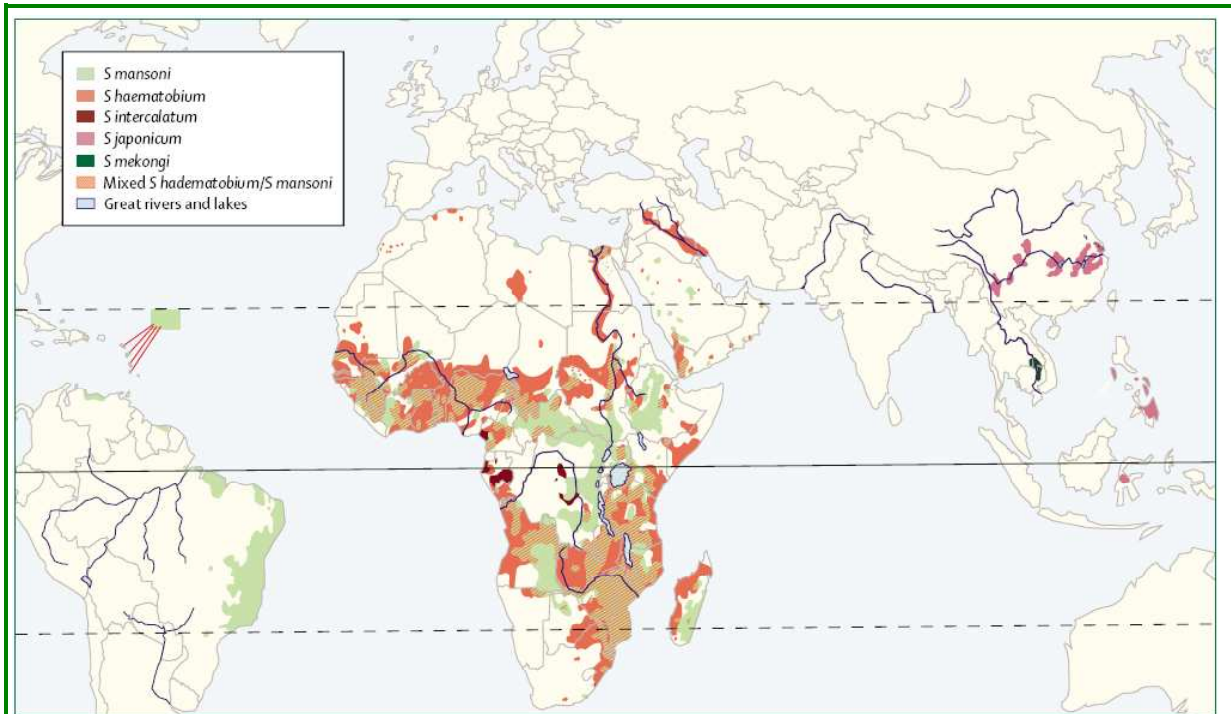


Figure 2 : Répartition mondiale des schistosomoses humaines, Gryseels et al, 2006.

S. mansoni : Afrique sub-saharienne, nord-est du Brésil, Surinam, Venezuela, les Caraïbes, Egypte et péninsule ibérique.

S. haematobium : Afrique sub-saharienne, vallée du Nil en Egypte et au Soudan, Maghreb et la péninsule arabe.

S. japonicum : Lacs centraux et rivière Yangtze en Chine, Mindanao, Leyte et d'autres îles des Philippines, Indonésie.

S. mekongi : bassin du Mékong au Laos et au Cambodge.

S. intercalatum : Afrique centrale et de l'ouest.

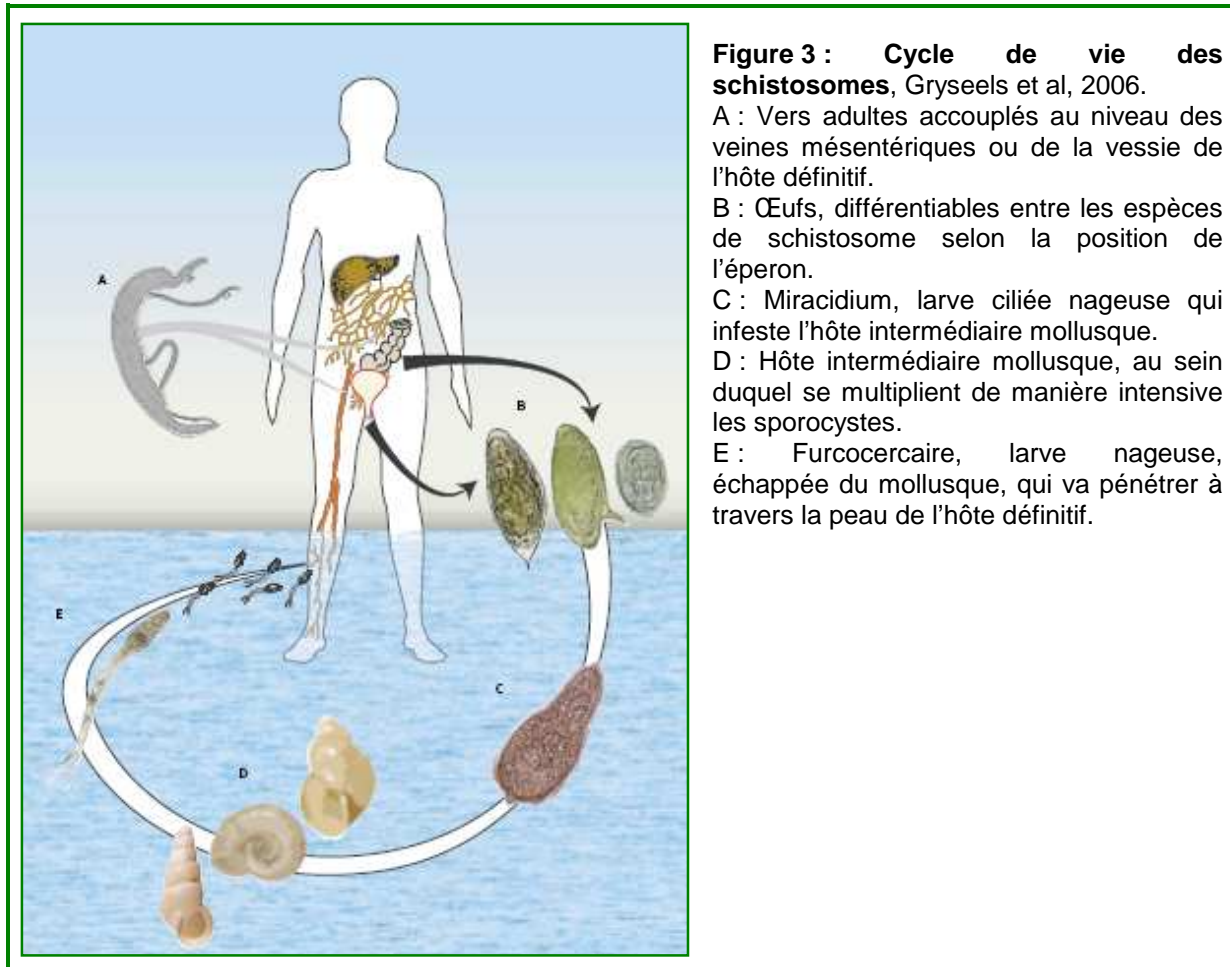
Cette répartition géographique entraîne donc l'exposition à la maladie de 600 millions d'individus. Environ un tiers de la population est touchée par la maladie, dont 85% en Afrique subsaharienne. De plus, elle provoque environ 200 000 morts annuellement dans cette dernière région [Chitsulo et al, 2000]. Enfin l'impact de la maladie (morbidité) sur les populations affectées (anémie, retard de croissance et scolaire des enfants) a été fortement sous-estimé par le passé [van der Werf et al, 2003]. L'ensemble de ces données fait de la bilharziose un problème majeur de santé publique, à l'heure actuelle la deuxième endémie parasitaire mondiale, après le paludisme [Chitsulo et al, 2000].

S. haematobium est responsable de la schistosomiase urinaire, la plus fréquente. Le parasite se loge dans le système urogénital, où les œufs se déposent. Ils causent des fibroses, allant jusqu'à la calcification du tractus urinaire et entraînant une possible prédisposition aux cancers de la vessie [Vennervald & Dunne, 2004]. Les 4 autres espèces citées précédemment sont responsables de la bilharziose intestinale et provoquent des diarrhées (possibilité de sang dans les selles), des hépto-splénomégalies, des granulomes vasculaires et inflammatoires, des fibroses périportales, de l'hypertension portale et des varices oesophagiennes. La forme générale des œufs, qui est différente selon les espèces

de schistosomes, est très utile en diagnostic, car la taille et la position de l'éperon sont les principaux caractères recherchés pour caractériser la maladie.

1.2. CYCLE DE VIE

Les schistosomes possèdent un cycle de vie complexe (**Figure 3**). En effet, ils présentent quatre stades morphologiquement distincts et 2 hôtes successifs : un mollusque d'eau douce, hôte intermédiaire et un mammifère, hôte définitif (**Figure 1**).



L'infestation de l'hôte vertébré définitif, se fait par la larve nageuse, la furcocercaire (ou cercaire, **Figure 3E**). Cette larve est constituée d'une tête et d'une queue bifide qui est perdue lors de la pénétration à travers la peau de sa cible. La cercaire libère son arsenal enzymatique qui lui permet de traverser de manière active et très rapide (en quelques minutes) la peau de l'hôte. Les têtes de cercaires se transforment en schistosomules et gagnent l'appareil circulatoire. Après quelques jours, les parasites migrent vers les poumons du mammifère puis vers le système hépatique et les veines mésentériques (pour le cas de *Schistosoma mansoni*) (**Figure 3A**) où ils se transforment en vers adultes. Ils atteignent leur maturité sexuelle, ce qui permet l'accouplement entre les mâles et les femelles au niveau du

foie. En effet les schistosomes ont la particularité de ne pas être hermaphrodites, mais gonochoriques, ce qui est unique au sein des plathelminthes. Cette configuration permet, d'une part, aux adultes d'être en accouplement permanent et, d'autre part, à la femelle de pondre quotidiennement une quantité considérable d'œufs, environ 300 œufs par jours pour *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. intercalatum*, plusieurs milliers pour *S. japonicum* et *S. mekongi* (**Figure 3B**). La ponte débute environ 4 à 6 semaines suivant l'infection par la furcocercaire, les œufs de schistosomes présentent une morphologie différente selon l'espèce à laquelle ils appartiennent (**Figure 1**). Les œufs pondus dans la lumière des veines mésentériques, suivent le flux sanguin. Grâce à leur éperon, aux substances sécrétées et à la réponse granulomateuse de l'hôte [Doenhoff et al, 1986], ils s'infiltrent et traversent les tissus de l'hôte. Une partie de ces œufs va être piégée au niveau des tissus et est à la base des complications de la maladie. Mais la majorité des œufs gagnent le système digestif et est éliminée avec les fécès (*S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. mekongi*, *S. japonicum*) ou dans l'urine (*S. haematobium*). Les œufs expulsés éclosent au contact de l'eau, ce qui donne naissance à des miracidia (**Figure 3C**), larves ciliées nageuses, qui à leur tour infestent l'hôte intermédiaire (**Figure 3D**). Ce dernier est spécifique de chaque espèce de schistosome. Au sein du mollusque, le miracidium donne naissance à un sporocyste primaire qui, par reproduction asexuée, engendre des sporocystes secondaires ou filles. Après 3 semaines au sein de l'hôte intermédiaire, des milliers de sporocystes sont produits, à partir d'un seul miracidium, et leur expulsion, sous forme de furcocercaires, permet la pérennité du cycle.

1.3. MALADIE, TRAITEMENT ET VACCIN

Les vers adultes ne sont pas par eux-mêmes les principaux responsables des pathologies lors de la schistosomiase. En effet, ce sont plutôt les centaines voir milliers d'œufs libérés quotidiennement par les femelles (**Figure 1**). Les vers adultes situés au niveau des veines mésentériques se nourrissent des hématies de l'hôte définitif, ce qui va créer une anémie. Cependant, les oeufs libérés lors de la ponte et piégés dans les tissus vont engendrer une réponse inflammatoire de la part de l'hôte définitif. Il y a formation de granulomes bilharziens. Suite aux infections successives, la multiplication des granulomes va engendrer une fibrose hépatique. Celle-ci va entraîner une occlusion vasculaire, au niveau hépatique pour *S. mansoni*, qui va créer une hypertension portale, une hépatosplénomégalie ainsi que la formation d'ascites accompagnée d'une circulation collatérale. L'apparition de varices oesophagiennes peut engendrer des hémorragies mortelles.

Afin de lutter contre la maladie et le parasite, il n'existe qu'un seul médicament efficace et majoritairement utilisée contre les 5 espèces de schistosomes touchant l'homme,

le praziquantel. Ce médicament a pour cible les vers adultes mais pas les œufs ni les vers immatures. Une heure après l'ingestion du médicament par l'homme, le parasite est paralysé suite à un violent influx calcique et son tégument est endommagé [Gryseels et al, 2006] au niveau des canaux calciques. Le parasite se détache de la paroi des vaisseaux sanguins, la membrane parasitaire est déstructurée, ce qui permet d'exposer, à la surface, les antigènes qui seront reconnus par le système immunitaire de l'homme. Le praziquantel possède cependant des failles, en effet il ne prévient pas de la réinfection (qui survient généralement 6 à 8 mois après le traitement). Toutefois, le mécanisme exact de l'action du praziquantel reste controversé. Bien qu'il interagisse avec un canal calcique voltage-dépendant [Greenberg, 2005], la corrélation entre cette interaction et la mort parasitaire n'est pas établie [Pica-Mattocchia et al, 2008].

L'utilisation massive du praziquantel a permis de réduire considérablement la morbidité associée à *S. mansoni*, en Egypte par exemple [Fenwick et al 2003]. Cependant cet usage en masse du praziquantel en monothérapie pose de nouveaux problèmes. Il y a, en effet, émergence de souches parasitaires résistantes au médicament, dont les premières traces ont été repérées au Sénégal et en Egypte [Stelma et al, 1995 ; Ismail et al, 1996]. Les travaux de Doenhoff ont montré qu'une résistance au praziquantel est sélectionnable au laboratoire, mais également que c'est un caractère qui est conservé puisque des parasites cultivés en absence de médicament conserve la résistance acquise lorsque du praziquantel est rajouté dans le milieu [Fallon & Doenhoff, 1994]. L'étude de Liang et al en 2003 montre, *in vitro*, que la résistance au praziquantel répond aux lois de génétique mendélienne, et donc que le caractère de résistance au médicament de certaines souches est dû à un gène ou groupe de gènes dominants. De plus, l'étude de Pica-Mattocchia et al, en 2009, montre que la transmission de la baisse de sensibilité au praziquantel ne semble pas être due à un changement drastique de la cible du médicament, mais plutôt de modifications dans le métabolisme du médicament. L'ensemble de ces études révèle la faiblesse de ce médicament et de par son inefficacité sur les formes immatures, nous pousse à trouver de nouvelles thérapies car dans tous les cas il semble que la résistance ou baisse de sensibilité au médicament soit un caractère sujet à la sélection, qui a tendance à être conservé et qui n'est pas perdu en absence de traitement des parasites par le médicament.

C'est pourquoi il est important, à ce jour, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, de trouver de nouveaux médicaments, qui permettraient de continuer la lutte anti-schistosome. En parallèle à l'identification de nouvelles cibles et de nouveaux traitements, certaines études ont pour but de développer des vaccins anti-schistosome, qui pourraient être une bonne alternative aux méthodes de traitement actuel. Parmi différents candidats vaccinaux testés, au laboratoire, la glutathion S-transferase 28 de *S. haematobium* (28-GST couplée à l'alun, sous le nom de Bilhvax) était le plus prometteur [Capron et al 2005]. En effet, Bilhvax

diminue de manière significative la fécondité du ver adulte femelle ainsi que la viabilité des œufs dans divers modèles animaux. A ce jour le vaccin est en phase III d'essai clinique et c'est le seul candidat vaccinal. Toutefois, l'utilisation de ce candidat vaccinal peut être concomitant à un traitement par le praziquantel et n'élimine pas le besoin de nouveaux agents chimiothérapeutiques contre la schistosomiase.

1.4. L'APPROCHE DE L'EQUIPE POUR LA CARACTERISATION DE NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES

L'apparition de plus en plus fréquente de souches de schistosomes résistantes au praziquantel, prouve l'intérêt grandissant de continuer à chercher et à identifier de potentiels médicaments anti-parasitaires. Dans cet esprit, depuis de nombreuses années au laboratoire, la recherche se focalise sur les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression génique qui est un mécanisme cellulaire essentiel. A travers les espèces il existe un grand nombre de protéines dont les fonctions biologiques ainsi que les structures sont particulièrement bien conservées. Cependant, au fil de l'évolution, de fins réseaux de régulation de l'expression des gènes ainsi qu'une diversification de ces mécanismes sont mis en place, ce qui permettrait d'expliquer la variation de l'expression génique au cours de l'évolution [Levine & Tjian, 2003]. En effet, l'analyse des génomes de métazoaires, et celui de *S. mansoni* [Berriman et al, 2009] ne faisant pas exception, montre que la complexité des organismes n'est pas corrélée avec une augmentation du nombre de gènes, mais plutôt par un accroissement des réseaux génétiques, accompagné par une régulation plus complexe de l'expression des gènes [Levine & Tjian, 2003]. Donc, la régulation de la transcription est un mécanisme central de la génération de la diversité et de la complexité animale. De ce fait, les acteurs centraux de cette régulation, les facteurs de transcription et leurs cofacteurs, sont les cibles de choix pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les schistosomes.

Après avoir étudié les récepteurs nucléaires [Bertin et al, 2004 ; Bertin et al, 2005 ; Oger et al, 2006], l'équipe du Dr Raymond Pierce s'est ensuite intéressée à leurs cofacteurs et en particulier ceux impliqués dans la modification des histones, dans un premier temps avec l'étude d'une famille de histone acétyltransférases (HAT), SmCBP/p300 [Bertin et al, 2006], puis avec l'étude des histones déacetylases (HDACs). Mes travaux de thèse ont contribué à la caractérisation des HDACs de *Schistosoma mansoni* et à étudier leurs rôles. Afin de mieux comprendre les différents acteurs de mes travaux de thèse, je décrirai dans un premier temps les mécanismes généraux de la transcription et de sa régulation complexe et dans un deuxième temps, je détaillerai plus précisément les mécanismes d'acétylation et de

désacétylation des histones, mécanismes auxquels je me suis intéressée au cours de mes trois années.

2. EPIGENETIQUE

Afin de transmettre à la descendance des caractères particuliers, la chromatine peut être modifiée, mutée. Cependant, il n'existe pas que les substitutions, délétions ou insertions au niveau de l'ADN, mais la chromatine fait l'objet de modifications au niveau du brin d'ADN ainsi que des protéines interagissant avec lui, appelées modifications épigénétiques, lesquelles vont engendrer des changements, qui seront conservés et transmis à travers la division cellulaire, et de façon transgénérationnelle (transfert à la génération suivante via les gamètes) [Youngson & Whitelaw, 2008]. Ces changements impliquent la méthylation de l'ADN, la substitution des histones au sein des nucléosomes, le remodelage des nucléosomes et leur localisation, ainsi que la modification des histones *via* l'ajout ou l'enlèvement de groupements (acétyle-, méthyle-,...) sur les histones mêmes.

2.1. GENERALITES

a. Structure de la Chromatine

L'information génétique est enfermée au sein d'une structure particulièrement complexe et dynamique mais parfaitement organisée, qui va permettre de varier l'expression des gènes.

Dans le noyau d'une cellule eucaryote, l'ADN n'est pas nu mais associé à des protéines, pour former un ensemble appelé chromatine, qui sera remodelé, condensé ou décondensé afin de réprimer ou d'activer la transcription et l'expression des gènes. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome. Il est composé d'une séquence d'ADN d'environ 150pb entourant un octamère de petites protéines basiques, histones, le tout organisé en une structure en collier de perles. La double hélice d'ADN s'enroule 1,6 fois autour de cet octamère protéique composé de 2 copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 (**Figure 4**) [Khorasanizadeh, 2004].

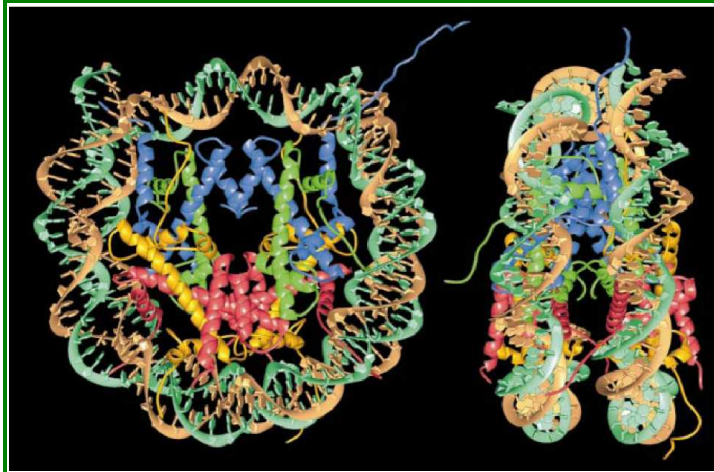


Figure 4 : Structure du noyau du nucléosome obtenu par diffraction aux rayons X, à une résolution de 2,8Å, Luger et al, 1997.

146pb d'ADN (marron et turquoise) enroulées autour des 8 histones, qui sont maintenues en place grâce aux liaisons hydrogènes et aux interactions électrostatiques.
H3 : bleu ; H4 : vert ; H2A : jaune ; H2B : rouge.

Un empilement de l'ADN de 6 fois est ainsi obtenu. La longueur de la région d'ADN internucléosomale varie selon l'espèce et le type cellulaire. C'est au niveau de cette région que les histones H1, sont incorporées. Les niveaux supérieurs de condensation de la chromatine résultent de contacts rapprochés entre les nucléosomes qui s'empilent pour former des fibres de 11 nm (diamètre du nucléosome), de 30 nm (ADN compacté environ 50 fois)... jusqu'à former, lors de la mitose, les structures extrêmement compactes que sont les chromosomes (la compaction d'environ 10.000 fois) (**Figure 5**).

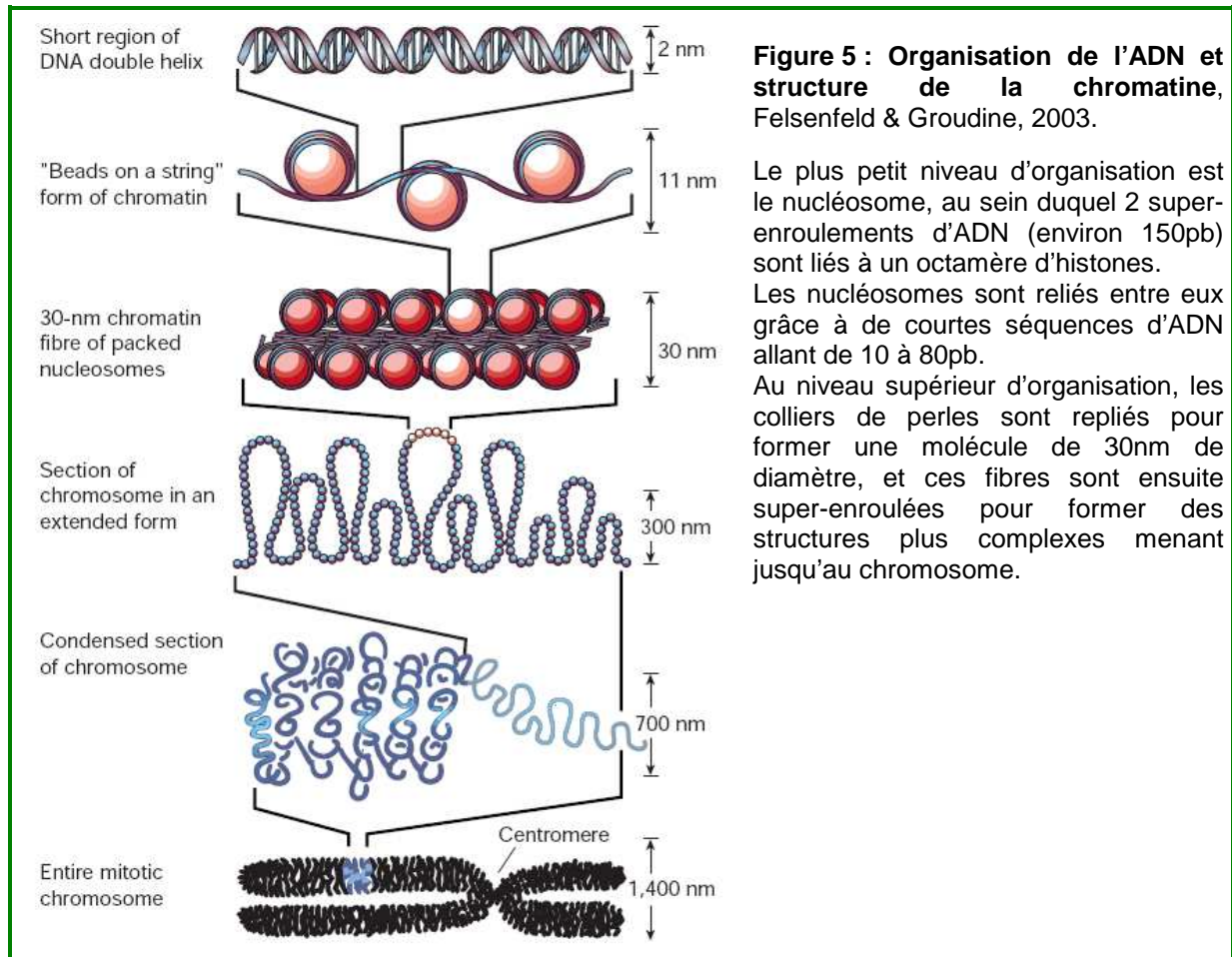
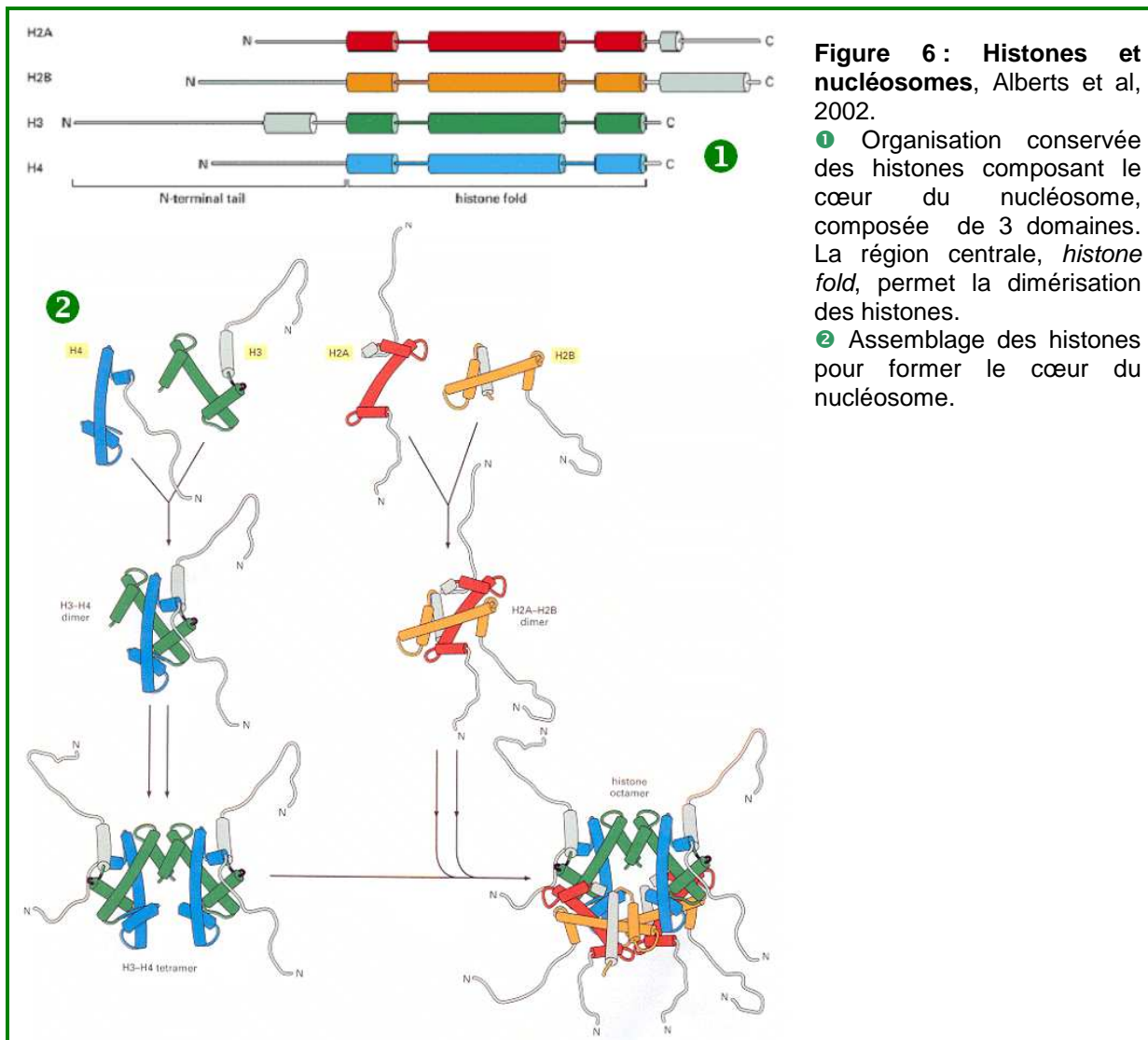


Figure 5 : Organisation de l'ADN et structure de la chromatine, Felsenfeld & Groudine, 2003.

Le plus petit niveau d'organisation est le nucléosome, au sein duquel 2 super-enroulements d'ADN (environ 150pb) sont liés à un octamère d'histones. Les nucléosomes sont reliés entre eux grâce à de courtes séquences d'ADN allant de 10 à 80pb. Au niveau supérieur d'organisation, les colliers de perles sont repliés pour former une molécule de 30nm de diamètre, et ces fibres sont ensuite super-enroulées pour former des structures plus complexes menant jusqu'au chromosome.

Les histones constituant le cœur du nucléosome (H2A, H2B, H3 et H4) possèdent une organisation globale conservée. En effet le domaine central, composé du motif « histone fold » comprend dans tous les cas trois hélices, séparées par deux boucles (**Figure 6①**). En revanche les extrémités N-terminales de ces protéines sont plus variables bien que toutes fortement riches en lysines. Elles sont dépourvues de structures secondaires mais font l'objet de nombreuses modifications post-traductionnelles et permettent entre autre le rapprochement des nucléosomes entre eux (Luger et al, 1997 ; Wolffe & Hayes, 1999). Le tétramère d'histones H3 et H4 est le premier à s'assembler à l'ADN encore nu, puis s'ajoutent les deux dimères d'histones H2A et H2B (**Figure 6②**).



L'histone internucléosomale, H1, n'est pas essentielle à la cellule mais permet la stabilisation du nucléosome [Shen et al, 1995]. Elle est moins conservée à travers les espèces que les histones du nucléosome. Cependant elle est composée de trois domaines avec chacun des propriétés bien définies. Le domaine central globulaire est essentiel pour

les interactions avec l'ADN. Quant aux deux extrémités amino- et carboxy-terminales, elles sont hautement basiques, soumises aux modifications post-traductionnelles et permettent le repliement de la chromatine en structures plus complexes grâce à la neutralisation des charges du squelette d'ADN [Wolffe, 1997 ; Wolffe & Hayes, 1999]. Ces histones permettent de créer des interactions entre les nucléosomes adjacents.

Cette structure chromatinienne est ensuite plus ou moins condensée afin de permettre ou non la transcription des gènes.

b. Etats de condensation de la chromatine et son remodelage

Deux états principaux de condensation chromatinienne sont connus :

- **L'euchromatine** (compaction de 1000 fois) où se situent essentiellement les gènes activement transcrits.
- **L'hétérochromatine** (compaction de 10 000 fois) constitutive et facultative. L'hétérochromatine constitutive renferme des séquences d'ADN non-codantes incluant les séquences satellites, répétées, qui sont souvent localisées au niveau des centromères et des télomères et qui restent invariablement silencieuses. En revanche, l'hétérochromatine facultative est constituée de régions d'euchromatine qui ont été converties en hétérochromatine, pour réprimer temporairement l'expression de certains gènes.

Dans les cellules eucaryotes, la chromatine présente une organisation majoritairement compacte dans laquelle les séquences d'ADN sont inaccessibles, ce qui les rend fonctionnellement inactives. L'état chromatinien détermine et contrôle l'accessibilité de l'ADN à divers facteurs nucléaires comme les facteurs de transcription [Felsenfeld & Groudine, 2003].

Afin de permettre le changement d'état de condensation de la chromatine, différents acteurs jouent un rôle à plusieurs niveaux. Nous répertorions trois grandes catégories de modifications entraînant un changement dans la structure et l'état de condensation de la chromatine, regroupées sous le terme d' « épigénétique » (**Figure 7**).

Il existe tout d'abord les composants de la chromatine, tels que l'histone H1 ou l'histone H2A qui peuvent se décrocher ou se modifier (macro H2A).

Il y a également des facteurs qui remodelent la chromatine.

Et finalement des modifications de la chromatine, au niveau des histones ou des acides nucléiques.

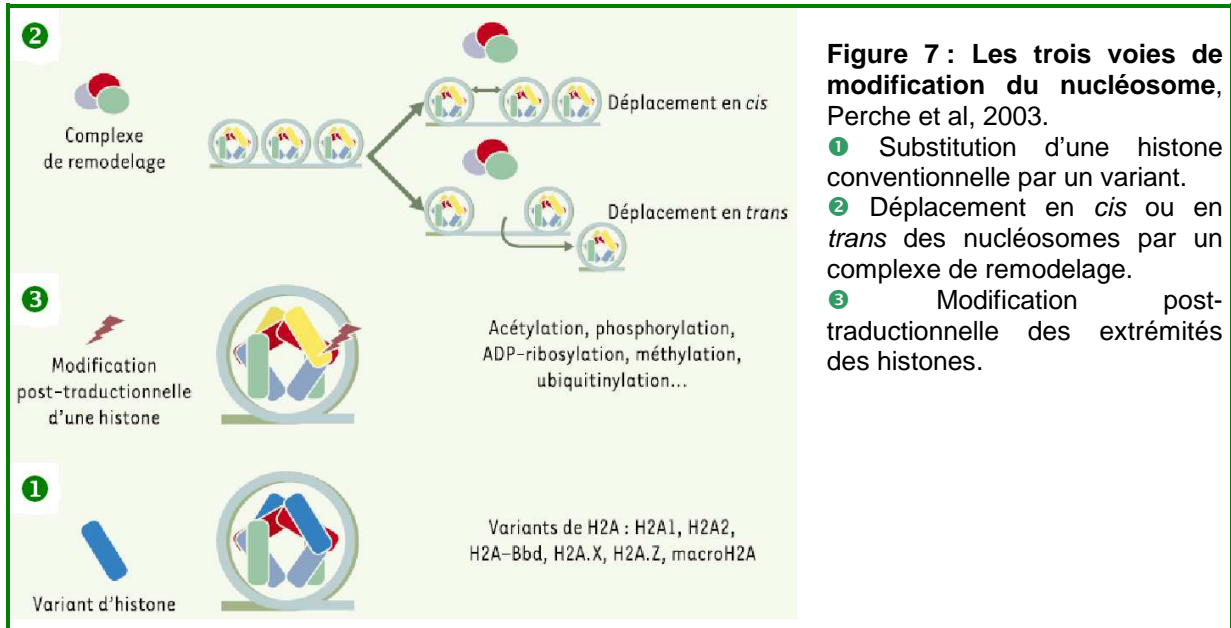
→ **L'Epigénétique**

L'épigénétique est définie comme un ensemble de caractères ou de changements héréditaires qui font varier l'expression d'un gène sans en modifier la séquence. Ces changements ont la particularité d'être réversibles, ce ne sont donc ni des délétions ni des substitutions de bases nucléotidiques, mais des modifications de la structure de l'ADN et des protéines l'entourant. Cependant ils sont héréditaires, donc transmis d'une cellule mère à sa cellule fille. Ceci permet la régulation de mécanismes fondamentaux lors du développement. Différents états de la chromatine sont ainsi obtenus correspondant soit à une chromatine décondensée et transcriptionnellement active soit à une chromatine condensée et transcriptionnellement inactive.

Le contrôle épigénétique permet entre autres choses de moduler l'accessibilité de l'ADN aux divers processus biologiques nucléaires, comme la transcription de gènes spécifiques et de maintenir cet état d'activité (soit actif soit silencieux) d'une génération cellulaire à l'autre. Ce contrôle peut être modulé au cours du développement (empreinte génétique, inactivation du chromosome X chez les mammifères femelles), de la différenciation cellulaire, du temps (vieillesse) et en réponse à des stimuli extérieurs [Jaenisch & Bird, 2003]. Le contrôle épigénétique permet également de maintenir le patrimoine génétique, par exemple en le protégeant d'attaques virales suite à l'inactivation des gènes viraux intégrés dans le génome. Les modifications épigénétiques peuvent avoir lieu à plusieurs niveaux : l'ajout ou l'enlèvement de modifications covalentes des histones et l'ajout de groupements méthyles sur l'ADN lui-même. Une dérégulation de ces modifications peut entraîner des maladies telles que des cancers [Jones & Baylin, 2002]. Des lésions épigénétiques, qui sont par exemple des changements dans la localisation ou dans la densité globale de l'ADN méthylé, un défaut dans une modification d'histone, induisent des défauts d'expression des gènes cibles, ce qui peut alors aboutir au développement de maladies [Feinberg, 2007].

→ **Variants d'histones**

Les histones, qui sont parmi les protéines les plus conservées chez les eucaryotes, permettent le contrôle des mécanismes impliqués dans l'expression génique. Cependant, des protéines ressemblant plus ou moins fortement aux histones ont été identifiées au sein des nucléosomes, à la place des histones. Ces « variants d'histones », connus depuis 1969, entraînent des changements dans des régions bien définies des chromosomes, ce qui modifie notamment l'expression génique [Pusarla & Bhargava, 2005]. Ils ont été regroupés



en deux classes, les variants homéomorphes et les hétéromorphes. La première catégorie est composée de variants dont la séquence ne diffère que de quelques acides aminés, sans conséquence sur leur mobilité électrophorétique. La seconde catégorie, au contraire, est composée des variants ayant une extrémité carboxy-terminale qui varie tant en séquence qu'en taille et qui modifie son profil électrophorétique [Perche et al, 2003].

Parmi les substitutions des histones, celles des histones H3 et H2A sont les plus fréquentes. En effet à elles seules pas moins de 9 variants ont été identifiés (**Figure 8**). Pour les histones H2B et H1 quelques variants sont répertoriés, ils interviennent lors de la spermatogenèse. En revanche, pour H4 aucun variant n'est connu, on suppose que cela est dû à son rôle important dans le maintien du nucléosome [Pusarla & Bhargava, 2005].

Variants				
Histone	Mammifère	Levure	Drosophile	Localisations ou fonctions associées
H3	H3.1			Phase S
	H3.2			Phase S
	H3.3	H3.3	H3.3	Régions transcriptionnellement actives
	Cenp-A	Cse4	Cid	Nucléosomes centromériques
H2A	H2A.Z	Htz1	H2Av	Maintenance de l'hétérochromatine au niveau des centromères et télomères, activation transcriptionnelle et viabilité
	H2A.W	H2A	H2Av	Points de cassure de l'ADN, condensation et <i>silencing</i> du chromosome sexuel mâle
	MacroH2A			Inactivation du chromosome X, intervient avec les facteurs de transcription et de remodelage comme SWI/SNF
	H2ABbd			Faible espacement entre les nucléosomes

Figure 8 : Tableau récapitulatif des principaux variants d'histones, d'après Pusarla & Bhargava, 2005.

Selon le contexte, différents variants peuvent remplacer une ou plusieurs histones du noyau du nucléosome. Chaque variant est impliqué dans une fonction différente et peut entraîner une modification de l'organisation chromatinienne.

La raison pour laquelle les histones H2A et H3 possèdent le plus de variants réside dans le fait que ces protéines soient facilement accessibles au sein du nucléosome et peuvent donc être aisément substituées, à l'inverse de H4. Contrairement aux histones « classiques », les variants sont synthétisés tout au long du cycle cellulaire (au lieu de la phase S uniquement) et s'insèrent dans le nucléosome indépendamment de la phase de réplication.

L'histone H3 possède 4 variants (**Figure 8**) :

- **CENP-A** (Centromere protein A) : qui est essentiel pour la structure et la fonction du centromère. Il diffère de H3 au niveau de la région amino-terminale [Ahmad & Henikoff, 2001].
- **H3.3** : entraîne l'activation immédiate des gènes qui sont habituellement silencieux en présence de H3 méthylée [Ahmad & Henikoff, 2002].
- **H3.1** et **H3.2** : sont impliqués lors de la phase S du cycle cellulaire [Pusarla & Bhargava, 2005]

L'histone H2A possède quant à elle 5 variants (**Figure 8**):

- **H2A.Z** : est important dans la régulation du *silencing* de certains gènes. Sa présence et sa fonction sont dépendantes de l'état transcriptionnel du promoteur sur lequel il est présent. Par exemple, il est nécessaire pour la réactivation de *Ino1* suite à une brève répression, en retenant *Ino1* en périphérie du noyau. Donc H2A.Z pourrait servir à identifier au niveau moléculaire les promoteurs de gènes récemment réprimés et permettre ainsi leur rapide réactivation [Brickner et al, 2007]. De plus il diffère fortement de H2, notamment au niveau de la région permettant l'interaction entre les 2 histones H2A ou H2A.Z, à tel point que H2A ne peut interagir avec H2A.Z. Donc si un histone H2A du nucléosome est substitué par un variant H2A.Z, le second est à son tour rapidement remplacé par un H2A.Z [Suto et al, 2000].
- **H2A.X** : voit sa fonction varier selon le niveau de phosphorylation de son extension carboxy-terminale (γ H2A.X). Par exemple, sa phosphorylation par une *Phosphatidylinositol-3-OH Kinase-related Kinase* (PIKK) activée lors de la voie de signalisation du récepteur au GABA_A permet son activation, ce qui régule la prolifération cellulaire des cellules souches [Andäng et al, 2008]. Il est généralement impliqué dans la réparation des cassures des doubles brins de l'ADN mais également dans sa réplication [Rogakou et al, 1998 ; Perche et al., 2003].
- **MacroH2A.1** et **macroH2A.2** : remplacent l'histone H2A au niveau du chromosome X inactif chez les femelles mammifères. Ces histones

possèdent en région carboxy-terminale un domaine de 25kDa non-histone, d'où leur préfixe « macro » [Constanzi & Pehrson, 1998 ; Chadwick & Willard, 2001].

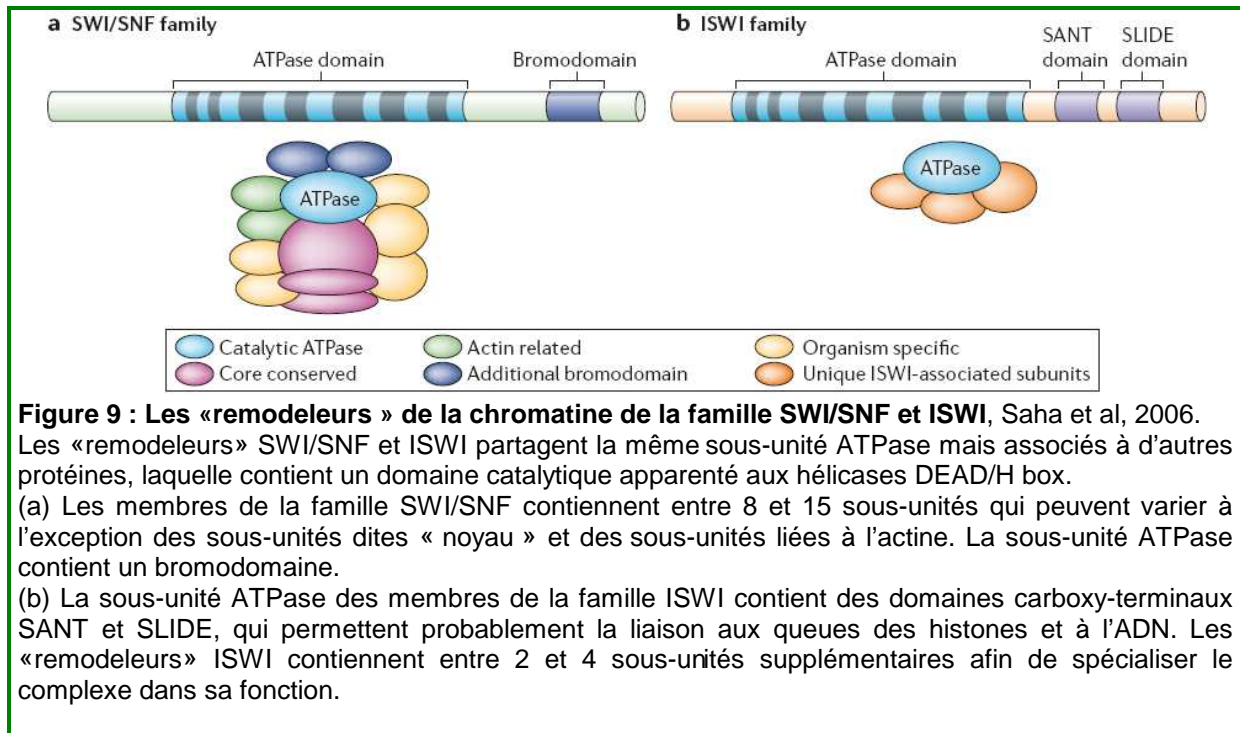
- **H2ABbd** (bar body deficient) : est présent dans les régions de forte activité transcriptionnelle car souvent associé à H4 acétylée [Chadwick & Willard, 2001].

→ **Les facteurs de remodelage**

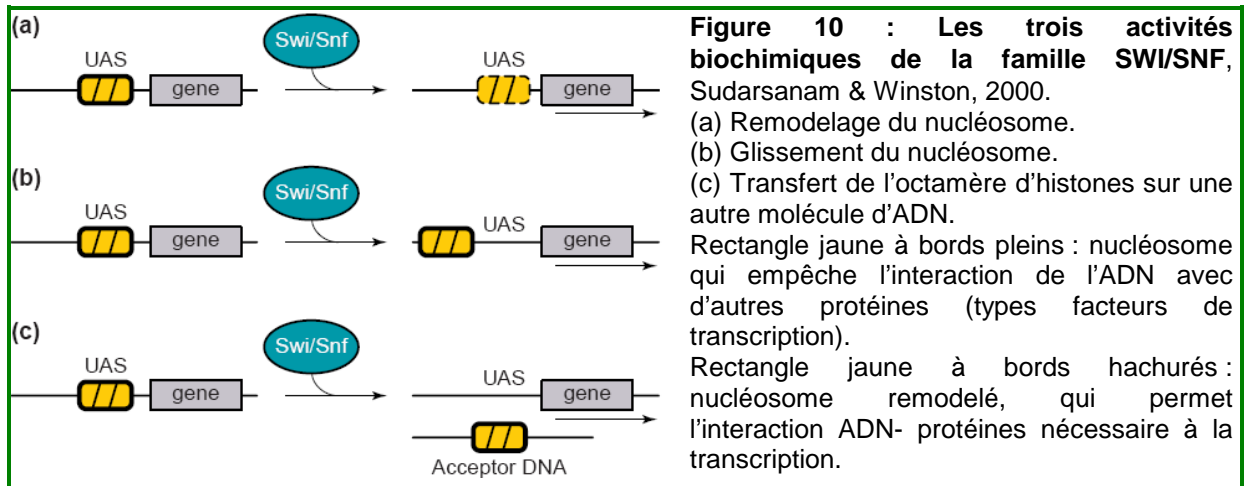
Parallèlement aux remplacements des histones par leurs variants, de nombreux complexes protéiques ATP-dépendants ont pour rôle de déstabiliser la chromatine, afin d'en modifier sa structure, dans un but final d'activer la transcription de gènes. En effet, l'activité ATPase des complexes modifie la structure nucléosomale grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Elle va entraîner des modifications dans le degré de torsion de la molécule d'ADN, et donc un changement dans les contacts ADN- histones. Ces facteurs entraînent un espacement des nucléosomes lors de l'assemblage de la chromatine, car ils peuvent soit faire glisser (action en *cis*) soit transférer (action en *trans*) les nucléosomes sur l'ADN. Ils jouent un rôle important au cours de la réplication de l'ADN ou de sa réparation, mais également dans le contrôle de l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription.

Cinq complexes multiprotéiques ont été jusqu'alors identifiés :

- **La Famille SWI/SNF** (*mating-type switching/ sucrose non fermenting*) a été caractérisée pour la première fois chez la levure. Les complexes possèdent une sous-unité ATPase conservée et au moins sept autres sous-unités (**Figure 9**), ce qui définit cette famille de complexes [Saha et al, 2006]. De manière générale, ils ont la capacité d'activer la transcription, bien que certaines observations inverses aient été notées [Sudarsanam & Winston, 2000]. Les régions carboxy-terminales à multiples bromodomains des sous-unités ATPase du complexe possèdent la capacité de se lier aux queues des histones acétylées, ce qui entraîne le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. Cette famille tend à désorganiser, rapprocher ou éloigner, les nucléosomes parfaitement alignés sur la chromatine. Elle conduit soit au remodelage direct des nucléosomes, soit au coulissement ou au transfert des histones sur un autre ADN (**Figure 10**). Ces changements permettent alors un recrutement des facteurs de transcription [Sudarsanam & Winston, 2000].



- **La Famille ISWI** partage également une sous-unité ATPase commune entre les différents membres de la famille et qui est la même que ceux de la famille SWI/SNF. En revanche, chaque complexe de la famille est constitué de plusieurs copies d'une sous-unité identique, mais propre à chaque complexe. Il reconnaît les queues des histones, ce qui permet son interaction avec l'ADN, notamment grâce à deux domaines (SANT et SLIDE) qui lui confèrent une activité hélicase. Le domaine SANT permet également l'interaction avec les *histones deacetylases*. Ils réorganisent alors les nucléosomes en les ordonnant et les espaçant tout le long du brin d'ADN [Saha et al, 2006]. A l'inverse de la famille SWI/SNF, la famille ISWI tend à réprimer la transcription dans la plupart des situations (de même, des observations contraires ont été mises en évidence, [Morillon et al, 2003]).



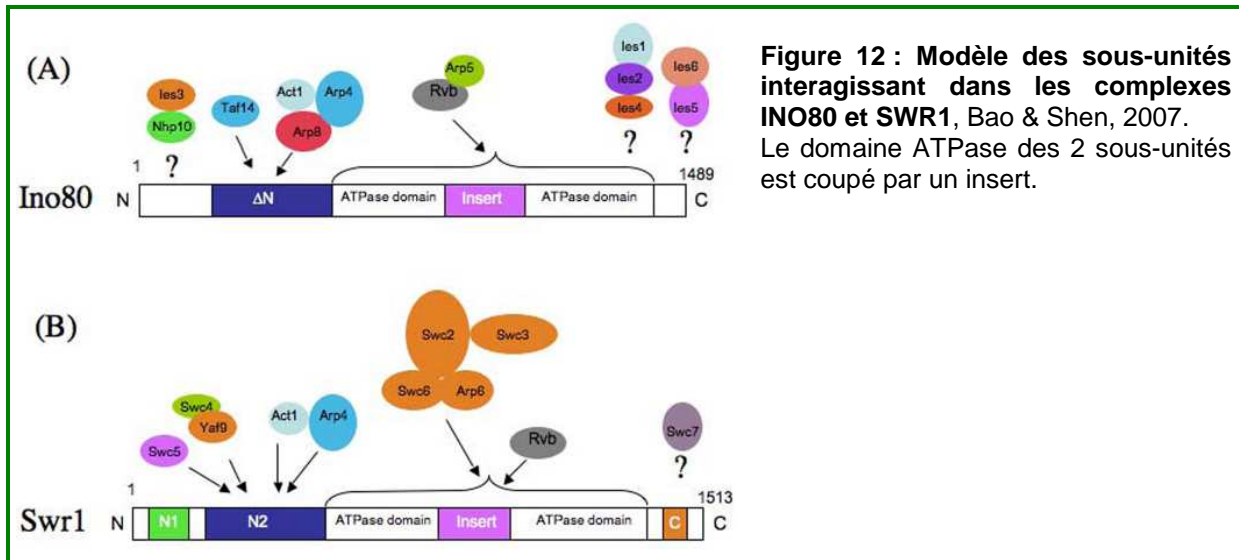
- **La Famille Mi2/CHD/NuRD** (*nucleosome remodeling and deacetylation*) entraîne une condensation de la chromatine, ce qui tend à réprimer la transcription [Brehm et al, 2000]. Composés de nombreuses sous-unités également, ces complexes possèdent entre autre une sous-unité à activité histone désacétylase et une sous-unité à activité ATPase, essentielle à leur bon fonctionnement (**Figure 11**). La majorité des sous-unités des complexes servent à cibler les sites d'action sur la chromatine et à réguler l'activité. Ils se fixent préférentiellement sur de l'ADN méthylé ou *via* un facteur de transcription accroché à l'ADN, ils ne s'accrochent pas *via* les nucléosomes comme la majorité des complexes de remodelage [Kunert et al, 2009].

Composant du complexe NuRD	Fonction
HDAC1, HDAC2	Histone désacétylases
RbAp46, RbAp48	Protéines se liant aux histones
Mi-2 α (CHD3), Mi-2 β (CHD4)	Protéines remodelant les nucléosomes, ATP-dépendantes
MTA1, MTA2	Méconnu
MBD3	Maintien?
p66	Méconnu

Figure 11 : Composition générale des complexes «remodeleurs» de la chromatine de la famille NuRD ainsi que leurs fonctions biochimiques, d'après Ahringer, 2000.


- **La Famille INO80** possède une grande similarité avec la famille SWI/SNF, cependant leur domaine ATPase est coupé en deux (**Figure 12a**). Les membres de cette famille ont une activité dépendante de l'ADN et des nucléosomes en plus de leur activité de remodelage de la chromatine. Ils possèdent tant un effet activateur qu'inhibiteur [Bao & Shen, 2007].
- **La Famille SWR1** est également une famille de complexes très proche de la famille SWI/SNF (**Figure 12b**). Leur rôle principal est le remplacement de l'histone H2A par son variant H2A.Z et l'implique donc dans la répression de

la transcription. Cependant elle intervient également dans la réparation des cassures de l'ADN [Bao & Shen, 2007].



c. Différentes modifications de la chromatine

Les deux composants de la chromatine, l'ADN et les histones, peuvent subir des modifications épigénétiques. Cependant ils ne sont pas exposés aux mêmes protéines et ne vont donc pas être touchés de la même façon. En effet, au niveau de l'ADN une seule modification a été mise en évidence, c'est la méthylation. En revanche les histones, elles, sont la cible de nombreuses enzymes de modifications, et peuvent être simultanément ou successivement méthylées, acétylées, phosphorylées, ubiquitinylées ou sumoylées (**Figure 130**). Les modifications post-traductionnelles touchent majoritairement les queues amino-terminales protubérantes des histones (**Figure 130**). Chacune de ces modifications a des conséquences sur la structure de la chromatine de la région touchée, ce qui va notamment modifier l'accessibilité à l'ADN dans ces régions. L'ensemble de ces changements va composer le « code des histones » [Jenuwein & Allis, 2001]. D'après ce principe, chaque combinaison de modifications conduit à une réponse biologique spécifique qui est traduite par un état de la chromatine particulier. Etant donné la grande diversité des modifications, le nombre de changements possibles sur chaque octamère d'histones est extrêmement élevé. De plus chaque marquage peut être temporaire ou au contraire à long terme, il sert d'identité à la cellule et peut ainsi être transmis de façon héréditaire aux générations cellulaires futures. De plus il existe une transmission possible à la descendance, par exemple, le cas des paramutations, mises en évidence à l'origine chez les plantes [Chandler & Stam, 2004] puis chez la souris [Rassoulzadegan et al, 2006]. Ce sont en fait des changements épigénétiques qui sont stables au cours du développement de l'organisme et qui est transmis à sa descendance. L'existence de plusieurs modifications sur une même histone

apporte une dimension supplémentaire au code des histones. En effet, une modification sur un site peut influencer la capacité d'un autre site à être modifié, de manière synergique ou au contraire antagoniste (**Figure 13** ).

Ces modifications de la chromatine sont des événements extrêmement importants dans une cellule, à tel point que le moindre dérèglement peut avoir des conséquences graves dans la cellule et son environnement. Dans la majorité des cas, un défaut de modifications post-traductionnelles va occasionner des problèmes dans l'expression génique et va conduire à des cancers.

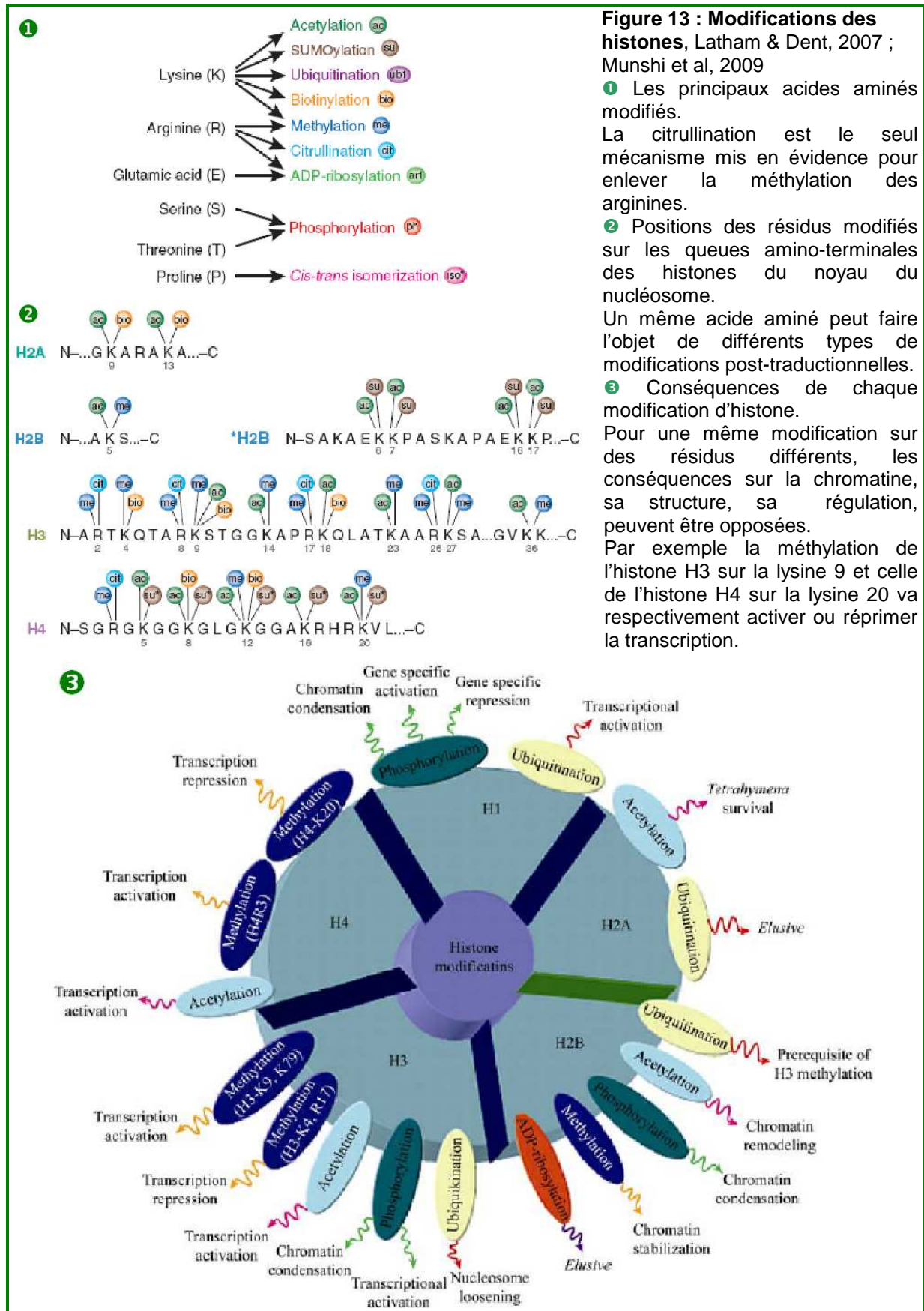


Figure 13 : Modifications des histones, Latham & Dent, 2007 ; Munshi et al, 2009

1 Les principaux acides aminés modifiés.

La citrullination est le seul mécanisme mis en évidence pour enlever la méthylation des arginines.

2 Positions des résidus modifiés sur les queues amino-terminales des histones du noyau du nucléosome.

Un même acide aminé peut faire l'objet de différents types de modifications post-traductionnelles.

3 Conséquences de chaque modification d'histone.

Pour une même modification sur des résidus différents, les conséquences sur la chromatine, sa structure, sa régulation, peuvent être opposées.

Par exemple la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 et celle de l'histone H4 sur la lysine 20 va respectivement activer ou réprimer la transcription.

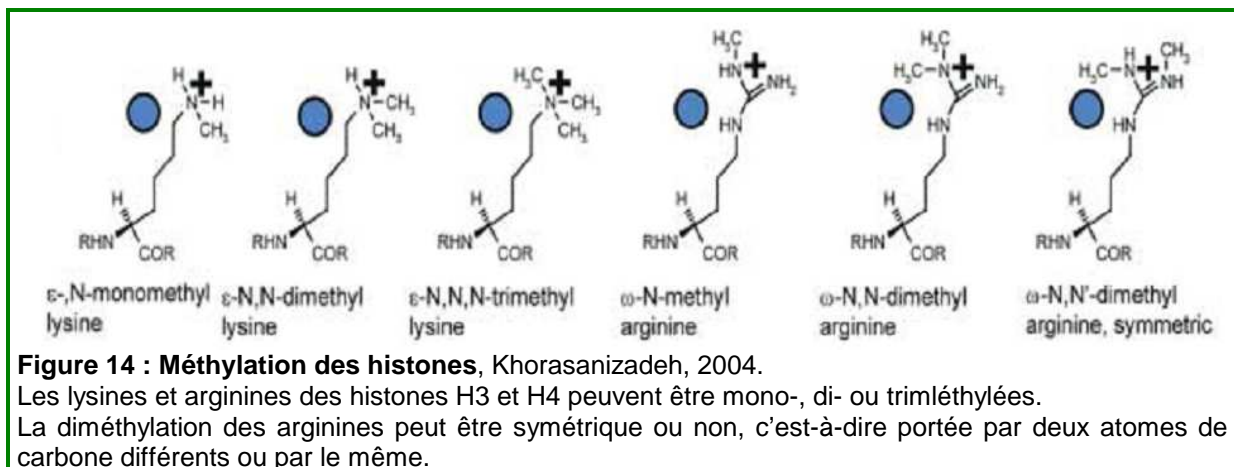
1. La Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN n'est pas un mécanisme répandu chez tous les organismes, par exemple elle est absente chez *S. cerevisiae*, *C. elegans* [Colot & Rossignol, 1999]. En revanche, lorsqu'elle est présente, chez les plantes, de nombreux vertébrés, certains champignons, ..., la méthylation de l'ADN est un phénomène extrêmement répandu à travers tout le génome. Elle permet de maintenir constamment silencieuses des régions chromosomiques entières ou simplement un gène, notamment dans les séquences génomiques répétées comme les ADN satellites, certains éléments transposables ou les rétrovirus endogènes. Chez les mammifères, la méthylation touche également les exons et est localisée aussi bien dans les gènes qu'à l'extérieur de ceux-ci, en raison de la colonisation des introns par les éléments répétés. Chez les plantes, à l'inverse, la distribution de ces éléments - et donc des méthylcytosines - est essentiellement intergénique [Prouteau & Colot, 2005]. D'un point de vue fonctionnel, la méthylation de l'ADN se fait au niveau du carbone 5 de la cytosine issue de dinucléotides CpG. Cette modification entraîne la répression de l'expression du gène touché car elle permet d'empêcher la fixation de facteurs activant la transcription ou au contraire de recruter des protéines de type *Methyl CpG Binding Protein* (MBP) [Klose et al, 2006]. Cependant certaines régions ne sont pas touchées par la méthylation, elles portent le nom d'îlots CpG. Ce sont des régions d'ADN riche en guanines et cytosines, qui sont généralement situées dans les régions promotrices de gènes constitutivement actifs ou ayant un profil d'expression tissu spécifique [Illingworth & Bird, 2009]. Cinq enzymes ont été identifiées comme méthylant l'ADN, ce sont des *DNA methyltransferases* (DNMT). DNMT1 permet de maintenir la méthylation au cours des divisions cellulaires successives, elle méthyle l'ADN nouvellement synthétisé. Aucune activité méthyltransférase n'a pu être mesurée pour DNMT2, bien qu'elle contienne le domaine conférant l'activité [Zheng et al, 2008]. Cependant une activité *RNA methyltransferase* a été mise en évidence [Goll et al, 2006]. Il en est de même pour DNMT3L, qui ne possède pas non plus d'activité DNA méthyltransférase, ceci par le fait qu'elle est délétée du domaine catalytique portant cette activité [Zheng et al, 2008]. Les DNMT3A et 3B, quant à elles, méthylent l'ADN *de novo*, c'est-à-dire qu'elles touchent des zones non méthylées. En effet au cours du développement embryonnaire, lorsque les gamètes mâles et femelles fusionnent, chaque cellule haploïde apporte son ADN méthylé. Afin de permettre un brassage chromosomique, tout l'ADN (maternel et paternel) est déméthylé puis sera re-méthylé progressivement au cours du développement. De plus ces trois enzymes peuvent également méthyle au cours de la vie cellulaire des îlots CpG qui resteront alors définitivement inactifs [Jaenisch & Bird, 2003].

Récemment et contre toute attente [Fantappiè et al, 2001], la présence de cytosines méthylées a été mise en évidence chez *S. mansoni*, par l'équipe du Pr Hoffmann [Communication personnelle]. Grâce à l'utilisation de plusieurs enzymes de restriction sensibles ou non à la méthylation, ils ont montré l'obtention de profils différents, reflétant la méthylation. Au cours de leurs travaux ils ont montré que la méthylation a lieu tout au long du cycle parasitaire, aussi bien au cours des stades libres que parasites.

2. La méthylation des histones

Parallèlement à l'ADN, les histones peuvent également être méthylées. Cette modification est spécifique de certains résidus arginine et lysine des histones H3 et H4. De plus ces acides aminés peuvent être mono-, di- ou tri-méthylés. Selon le résidu méthylé (**Figure 14**) et le niveau de méthylation, les conséquences sur la chromatine et son fonctionnement seront différentes (**Figure 13**).



En effet, la méthylation des histones va avoir des conséquences sur la régulation de la transcription, le *gene silencing* au niveau des télomères des chromosomes, la réparation de l'ADN,... Il existe deux catégories d'enzymes capables de méthyler les lysines, ce sont les *lysines specific histone methyltransferases* (HMTs), qui vont ou non contenir un domaine SET. Chaque enzyme de ces deux familles est substrat spécifique. Pour la méthylation des arginines, ce sont des *arginine methyltransferases* (PRMTs) qui vont agir (**Figure 15**) [Shilatifard, 2006]. La méthylation est une modification épigénétique extrêmement stable, d'ailleurs on a longtemps pensé qu'il n'existait pas de déméthylases, afin d'ôter les méthylations. Cependant, en 2004 Shi a mis en évidence LSD1 (*Lysine specific demethylase 1*) qui a pour particularité d'enlever les résidus méthyles sur les lysines mono- ou di-méthylées mais pas sur celles qui sont tri-méthylées. Par la suite de nombreuses autres enzymes déméthylases des lysines ont été mises en évidence, elles ont été répertoriées en

deux groupes, les protéines à domaine LSD1 et les protéines à domaine JmjC (jumonji – cruciform en japonais) [Kouzarides, 2007]. Pour la déméthylation des arginines, leur mécanisme est particulier, la protéine PAD14 (*peptidyl arginine deiminase 4*) a la capacité de convertir l'arginine en citrulline, en enlevant la méthylation avec le groupement imine de l'arginine [Bannister & Kouzarides, 2005]. Elle agit sur les mono-méthylations et non sur les di-méthylations. C'est le seul mécanisme mis en évidence à l'heure actuelle, parfois appelé citrullination (**Figure 13**)

Les effets des marquages des histones par la méthylation peuvent avoir des conséquences sans aucune synergie. En effet, la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) est impliquée dans le recrutement du complexe Trithorax associé aux gènes actifs. En revanche, la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) permet le recrutement du complexe Polycomb répresseur de transcription (les protéines Polycomb conduisent à la formation de structures condensées et inactives, alors que les protéines trithorax ouvrent la chromatine et permettent à l'ADN d'exprimer son information génétique pour obtenir les ARNs et protéines cellulaires). Ce qui est plus surprenant, c'est que ces deux marques sont retrouvées simultanément sur les mêmes promoteurs chez la souris ou dans les cellules embryonnaires humaines. Ces observations montrent donc que des marques activatrices et répressives coexistent, ce qui sous-entend que ce mode d'action est bivalent [Herz et al, 2009].

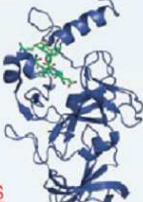

Histone methyltransferases (HMTs)				
SET domain lysine HMTs				
 <p>1O9S 3D View</p>	Sc Set1 ^a , SET1A & 1B	H3K4	Sp Clr4	H3K9
	MLL1-4 ^a	H3K4	Dm E(z) & EZH2	H3K27(EZH2, H1bK26) ^a
	Ash1 ^a	H3K4	SET2	H3K36
	SUV39H1 & H2	H3K9	NSD1	H3K36
	ESET/SETDB1	H3K9	SMYD2	H3K36
	Nc DIM-5	H3K9	SUV420H1 & H2	H4K20
	RIZ1	H3K9	SET7/9	H3K4
	G9a	H3K9	SET8/PR-SET7	H4K20
	EuHMTase1	H3K9		
Non-SET domain lysine HMTs				
 <p>1QRI 3D View</p>	Sc Dot-1 & DOT1L	H3K79		
	Arginine HMTs			
	CARM1	H3R2/17/26	PRMT5	H3R8/H4R3
	PRMT1/Sc Hmt1	H4R3	PRMT6	H3R2

Figure 15 : Histone methyltransferases, d'après Ris-Vicari K, 2007.

Sont répertoriées les enzymes humaines mais également de quelques organismes modèles (*S. cerevisiae*; *S. pombe*; *N. crassa*; *T. thermophila*; *D. melanogaster*).

3. L'acétylation des histones

Cette modification, au niveau des lysines des histones du noyau du nucléosome, est réversible et très dynamique. Les histones acétyl-transférases (HAT) vont ajouter un groupement acétyle aux acides aminés et les histones désacétylases vont les enlever. Tout

comme la majorité des modifications post-traductionnelles citées précédemment, les acétylations vont avoir des conséquences sur la structure chromatinienne. Le groupement acétyle ajouté neutralise la charge positive des queues des histones, ce qui permet un relâchement des interactions ADN-histones et inter-nucléosomes. Ceci va rendre une chromatine plus flexible qui sera plus accessible aux facteurs de transcription. De manière générale, l'acétylation entraîne une décondensation de la chromatine ce qui permet l'activation de la transcription. En revanche la désacétylation est plutôt répressur de la transcription, car elle lui permet de se refermer sur elle-même. L'acétylation des histones a un rôle dans la progression cellulaire, la recombinaison, la réparation de l'ADN et l'apoptose [Carrozza et al, 2003]. De plus elle interagit également avec les autres modifications des histones. Par exemple, la phosphorylation de la tyrosine 119 de l'histone H2 est essentielle pour maintenir l'acétylation des lysines 14 de l'histone H3 et 5 de l'histone H4 [Latham & Dent, 2007].

L'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 (H4K16) est importante pour la structure de la chromatine. En effet à elle seule elle limite sa compaction et diminue l'interaction entre les fibres nucléolaires. Son niveau d'acétylation régule son association avec différents facteurs, par exemple H4K16 non acétylée interagit avec SIR3 [Suka et al, 2002] en revanche lorsqu'elle est acétylée l'interaction se fait avec TAF1 [Jacobson et al, 2000] ou encore GCN5 [Dhalluin et al, 1999] et elle régule l'activité de plusieurs protéines [Makowski et al, 2001 ; Corona et al, 2002 ; Shogren-Knaak, 2006]. Globalement H4K16 ne dicte pas systématiquement la même série d'événements moléculaires selon son niveau d'acétylation, et peut même aboutir à des effets opposés.

4. Autres modifications des histones

→ La **phosphorylation** des histones se fait sur deux acides aminés au niveau de la queue de la protéine cible. Ce sont les sérines et les thréonines (**Figure 13**). Ces modifications sont impliquées dans la régulation de la transcription, la réparation et la condensation de la chromatine [Kouzarides, 2007]. La phosphorylation la plus étudiée est celle de la sérine 10 de l'histone H3 (H3S10). C'est une modification extrêmement dynamique au cours du cycle cellulaire. En effet en fin de phase G2 H3S10 est phosphorylée au niveau de la chromatine péricentromérique, puis au cours de la prophase elle s'étend sur tout le chromosome, pour finalement être perdue en anaphase. Il existe donc une corrélation spatio-temporelle entre la condensation de la chromatine et la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3. Cette modification semblerait être essentielle pour l'activation de la transcription des « *immediate early genes* » (les gènes activés rapidement suite à un stimulus cellulaire) [Berger, 2002]. L'histone H1, externe au cœur du nucléosome, peut

également être phosphorylée, ce qui affaiblit sa liaison à l'ADN [Wolffe & Hayes, 1999]. La déphosphorylation est un mécanisme très répandu, la famille de protéine phosphatases 1 (PP1) va enlever les phosphates sur les acides aminés des histones [Khorasanizadeh, 2004].

→ L'**ubiquitinylation** est une modification qui touche spécifiquement les lysines des histones. Ce changement post-traductionnel module la transcription soit en entraînant la dégradation des facteurs de transcription par le protéasome (les histones eux ne sont pas dégradés par le protéasome), soit en recrutant des complexes modifiant la chromatine. De manière générale, cette modification permet d'activer ou de maintenir la transcription, car elle garde la chromatine ouverte [Zhang, 2003]. Elle peut également servir pour la réparation de l'ADN [Kouzarides, 2007 ; Khorasanizadeh, 2004]. Il a été observé que l'ubiquitinylation interagit avec beaucoup d'autres modifications des histones. En effet, cette modification peut soit entraîner la modification d'autres résidus d'une même histone (en *cis*) ou d'autres histones (en *trans*), soit être la conséquence de modifications d'histones en *cis* ou en *trans*. Par exemple, l'ubiquitinylation de la lysine 123 de l'histone H2B est nécessaire pour la méthylation des lysines 4 et 79 de l'histone H3 pendant la transcription [Sun & Allis, 2002].

→ Les **small ubiquitin-related modifiers** (SUMO) sont des modifications post-traductionnelles apparentées aux ubiquitinylations, elles ont lieu sur les quatre histones du nucléosome. Elles ont un rôle antagoniste vis-à-vis de l'acétylation et de l'ubiquitinylation, car elles touchent les mêmes résidus, les lysines [Kouzarides, 2007]. La sumoylation des lysines 6 et 7 de l'histone H2B empêche l'ubiquitinylation de la lysine 123 de l'histone H2B. Ce qui est remarquable c'est que ce phénomène est bidirectionnel [Latham & Dent, 2007]. Contrairement à l'ubiquitinylation, la sumoylation a tendance à réprimer la transcription [Shiio & Eisenman, 2003, Latham & Dent, 2007].

→ L'**ADP ribosylation** touche les résidus arginine et glutamate. Actuellement, seule l'arginine 1 de l'histone H2B a été identifiée comme cible, cependant on sait que d'autres sites existent [Kouzarides, 2007]. Elle permet d'ouvrir la chromatine et de la rendre active en modifiant les interactions ADN-histones, mais également les interactions entre nucléosomes [Hassa et al, 2006]. La réaction se fait selon deux catégories d'enzymes, les *mono-ADP-ribosyl-transferases* (MARTs), qui ajoute un ribose par acide aminé, ou les *poly-ADP-ribose-polymerases* (PARPs), qui poly-ribosylent les résidus [Kouzarides, 2007].

→ L'**isomérisation des prolines** : Les résidus proline des peptides peuvent adopter deux conformations, en *cis* et en *trans*. Ces états tridimensionnels modifient fortement la structure secondaire des polypeptides [Kouzarides, 2007]. Ce changement de conformation modifie la structure de la chromatine en régulant les interactions ADN-histone [Nelson et al, 2006].

→ La **biotinylation** touche les lysines des histones H2A, H3 et H4 (H2AK9, K13, K125, K127 et K129, H3K4, K9 et K18, H4K3, K8 et K12) [Hassan et al, 2006]. Sur le plan fonctionnel, ces modifications interviendraient dans la formation de l'hétérochromatine, la condensation des chromosomes lors de la mitose, la régulation de l'expression génique et dans la réponse aux traitements dénaturants de l'ADN [Hassan et al, 2006].

2.2. ACÉTYLATION/ DESACÉTYLATION

Nous avons vu à travers la première partie de l'introduction que de nombreux mécanismes sont impliqués dans la régulation génique. La molécule d'ADN ne se suffit pas elle-même, de nombreux facteurs extérieurs interviennent et ont leur importance. C'est donc la mise en place d'une fine régulation qui permet à tout cet ensemble de fonctionner, et un dysfonctionnement dans cette machinerie aboutit, bien souvent, à un cancer.

Au cours de cette deuxième partie d'introduction, nous allons nous concentrer sur l'acétylation des lysines. Ce changement a lieu sur les histones mais également de nombreuses autres protéines cellulaires. Les *Histones acetyltransferases* (HATs) ajoutent un groupement acétyle aux lysines des histones et les *Histones Deacetylases* (HDACs) les enlèvent. Ces deux familles de protéines agissent sous forme de complexes, qui déterminent la spécificité de substrat des enzymes ainsi que leurs interactions avec d'autres protéines, ADN ou nucléosomes. L'acétylation de différents résidus est coordonnée, elle peut être spécifique ou non mais dans tous les cas va entraîner des modifications de la structure chromatinienne [Shahbazian & Grunstein, 2007].

a. Les *Histones AcetylTransferases* (HATs)

En 1964, les travaux d'Allfrey et de ses collaborateurs ont permis de montrer que l'acétylation est associée à la synthèse d'ARN et que celle-ci est plus efficace lors de l'acétylation [Allfrey et al, 1964]. En fait les HATs sont des enzymes qui utilisent l'acétyl coenzyme-A (AcCoA) comme donneur et qui acétylent l' ϵ -amine des résidus lysines [Berndsen & Denu, 2008]. Ce changement neutralise la charge positive des lysines, ce qui altère l'interaction entre protéines mais également les interactions protéines/ADN. Les HATs remodelent la chromatine au niveau des régions promotrices des gènes afin de faciliter le recrutement des facteurs de transcription et autres complexes impliqués dans la régulation transcriptionnelle. Le profil d'acétylation de différents gènes reflète donc les enzymes recrutées aux différentes étapes de la transcription, ce qui pourrait contribuer à la complexité du « code des histones ». Les HATs ont comme substrat les histones, mais également des régulateurs de la transcription (facteurs de transcription ou protéines de la machinerie

transcriptionnelle : p53, E2F1, EKLF, TCF, HNF4, TFII β , TFIIIF, ...), des protéines de structure (tubuline et polyamine) et des protéines impliquées dans l'importation nucléaire (importine α) [Marmorstein & Roth, 2001]. L'activité acétylase par les HATs sur les protéines autres que les histones porte le nom de *Factor AcetylTransferase* (FAT). Il existe deux types de HATs [Marmorstein & Trievel, 2009] :

- HATs de type A dites nucléaires : qui sont regroupées en plusieurs familles et basées sur une séquence conservée et un domaine HAT.
- HATs de type B dites cytoplasmiques : impliquées dans le dépôt des histones et l'acétylation d'autres protéines.

Les différentes familles de HATs nucléaires ont des substrats différents et agissent dans différents contextes. C'est l'association d'autres protéines avec une HAT, pour former des complexes (**Figure 16**), qui régit la spécificité du substrat ainsi que leur fonction dans la transcription. Par ailleurs les HATs peuvent agir de façon plus globale et acétyler les nucléosomes à travers tout le génome, pas seulement au niveau d'un gène spécifique. Par exemple, Gcn5 et Esa1 acétylent les histones des nucléosomes adjacents à de larges domaines contenant des séquences codantes et intergéniques [Shahbazian & Grunstein, 2007].

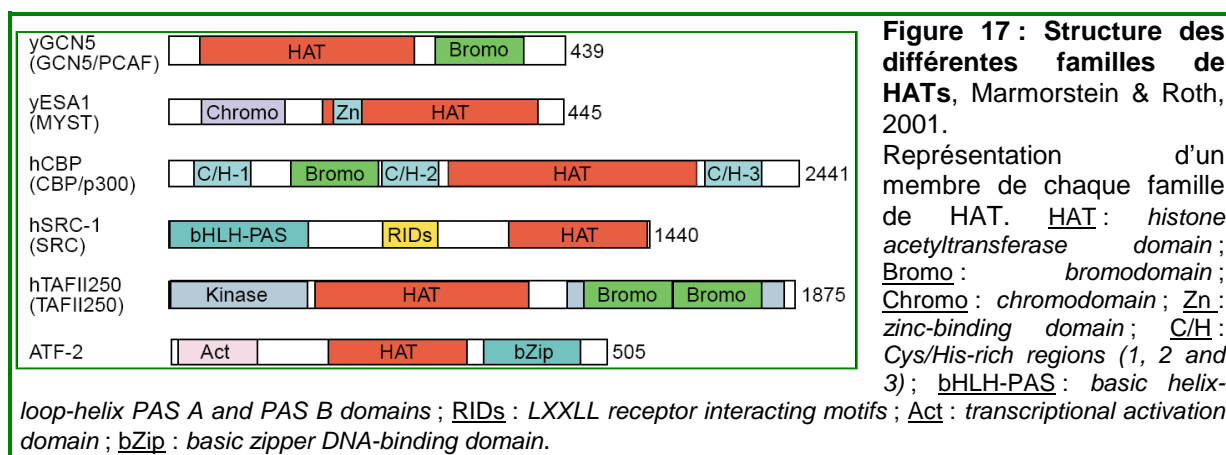
HAT	Substrate
GCN5/PCAF family	
Gcn5	H3 (14), H4 (8, 16)
PCAF	H3 (14), p53 (320), MyoD (99, 102, 105) E2F1 (117, 120, 125), HMG I(Y) (71)
GCN5/Ada	H3 (14, 18), H2B (nucleosomes)
GCN5/SAGA	H3 (9, 14, 18), H2B (nucleosomes)
PCAF/complex	H3, H4 (nucleosomes)
MYST family	
Esa1	H4 (5, 8, 16), H3 (14), H2A (5)
MOF	H4 (16), H3, H2A
Tip60	H4, H3, H2A
Sas3	H3, H4, H2A
Esa1/NuA4	H4, H2A (nucleosomes)
Sas3/NuA3	H3 (nucleosomes)
MOF/MSL	H4 (nucleosomes)
CBP/p300	H2A (5), H2B (12, 15), H3 (14, 18), H4 (5, 8), p53 (373, 382), HMG I(Y) (65), TFIIIF
SRC-1	H3 (9, 14)

Figure 16 : Substrat des HATs et de certains complexes, Marmorstein, 2001.

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

La première enzyme de cette famille identifiée est la HAT A de *Tetrahymena*, elle est l'orthologue de GCN5 (*General Control Nonderepressible 5*) de levure. Par la suite l'orthologue de GCN5 a été identifié chez de nombreux organismes, dont l'Homme où deux isoformes dues à un épissage alternatif et nommées : GCN5 et PCAF (*p300/CBP-Associated Factor*) [Timmermann et al, 2001]. Chez *Schistosoma mansoni* également,

GCN5 a été identifiée [de Moraes Maciel et al, 2004] et son activité sur H3K14 ainsi que des facteurs de transcription démontrée [de Moraes Maciel et al, 2008]. Les GCN5 sont des coactivateurs pour un grand nombre d'activateurs de la transcription [Marmorstein, 2001]. A travers les membres de cette famille, nous observons un ou plusieurs motifs conservés, avec cependant une homologie de séquence limitée (**Figure 17**). Il existe un domaine HAT de 160 acides aminés environ en région amino-terminale et un bromodomaine en région carboxy-terminale qui permet le ciblage du motif lysine acétylée. De plus il existe une séquence avec des homologies composée de quatre segments de 15 à 33 acides aminés, nommés de A à D [Marmorstein, 2001 ; Marmorstein & Roth, 2001]. Ces motifs forment un domaine dont la structure est conservée qui contient trois feuillets β anti-parallèles et une hélice. Les protéines de la famille GNAT possèdent également une région conservée boucle-feuillets β juste en aval des motifs A-D et qui forme le domaine central conservé. Ce domaine conservé joue un rôle dans la catalyse et permet l'interaction avec le Coenzyme A [Marmorstein & Roth, 2001]. La protéine PCAF a la capacité de s'auto-acétyler au niveau du signal de localisation nucléaire, cette modification sert pour augmenter son activité HAT. Il semble donc que certaines HATs possèdent un mécanisme analogue aux kinases et à leur système d'autophosphorylation puis de phosphorylations en cascade pour leur régulation [Santos-Rosa et al, 2003].



Chez l'Homme GCN5 et PCAF interagissent avec une HAT d'une autre famille, CBP/p300. Ensemble, elles participent à des complexes HATs similaires dans la cellule et sont impliquées dans la régulation de la transcription et le contrôle du cycle cellulaire. La surexpression de PCAF entraîne un arrêt du cycle cellulaire à cause d'un défaut dans la balance d'interaction avec deux régulateurs du cycle cellulaire, E2F et p53. L'acétylation de E2F par PCAF se fait dans la région qui permet sa liaison avec l'ADN, ce qui permet d'augmenter l'activité transcriptionnelle de E2F et qui permet sa stabilisation. Au contraire p53 est un gène supresseur de tumeur qui réprime la progression du cycle cellulaire et l'entrée en phase de synthèse (phase S). L'acétylation de p53 par PCAF augmente sa

capacité de liaison à l'ADN. Donc PCAF est acteur de deux scénarios opposés, soit l'activation du cycle cellulaire lors de l'acétylation de E2F ou au contraire sa répression lors de l'acétylation de p53. De manière générale, une mutation dans la région contrôlant l'activité HAT des protéines de la famille GNAT a des effets sur la prolifération cellulaire et la formation de tumeurs. Une souris KO pour PCAF est viable et fertile, en revanche une souris KO pour Gcn5 meurt au cours du développement embryonnaire [Timmermann et al, 2001].

2. La famille CBP/p300

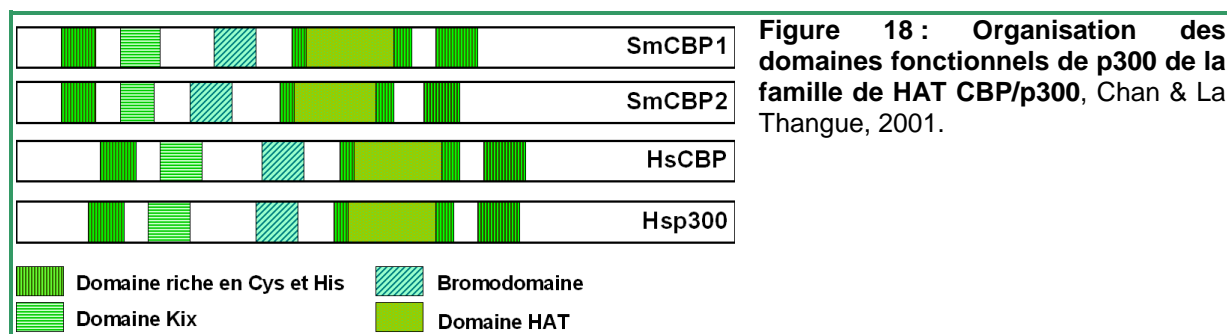
Cette famille est constituée de deux protéines fortement homologues de grande taille (environ 300kDa). Ce sont des coactivateurs globaux de la transcription dont l'expression est ubiquitaire, qui interagissent avec diverses protéines telles que des facteurs de la machinerie basale de la transcription, des récepteurs nucléaires... Ils jouent un rôle critique dans la croissance cellulaire, la différenciation, l'apoptose et la transformation [Timmermann et al, 2001].

CBP (*CREB- Binding Protein*) est un coactivateur du facteur de transcription CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*) et est impliqué dans le développement du système hématopoïétique, dans la prévention des défauts hématologiques. CBP est la cible de plusieurs cas de translocations chromosomiques responsables de leucémies chez l'Homme, comme, par exemple, les fusions CBP-MOZ et CBP-MLL. De plus une mutation dans le gène codant CBP provoque le syndrome Rubinstein-Taybi qui se manifeste par un retard mental et des défauts crâno-faciaux [Timmermann et al, 2001]. Chez le schistosome, deux orthologues ont été identifiés SmCBP1 et SmCBP2 [Bertin et al, 2006].

p300 est une cible de la protéine adénovirale E1A et possède un rôle supresseur de tumeur. L'apparition de mutation dans le gène provoque le développement de cancers chez l'Homme. Son expression semble être ubiquitaire. L'interruption du gène p300 chez la souris entraîne la mort au cours du développement embryonnaire, due à des défauts de prolifération cellulaire et un mauvais développement des tissus cardiaques fœtaux [Timmermann et al, 2001].

Cette famille de HATs possède des homologies de domaine avec la famille GNAT (**Figure 17** et **Figure 18**). CBP et p300 possèdent un large domaine HAT d'environ 500 acides aminés, un bromodomaine, un domaine KIX et un domaine d'homologie avec la protéine Ada2. De plus trois régions riches en résidus histidines et cystéines sont répartis sur toute la protéine, ils portent respectivement les noms de TAZ, PHD et ZZ et ont une structure en doigts de zinc. Les domaines nommés TAZ (ou CH1), ZZ (ou CH3) et KIX, sont impliqués dans les interactions entre les protéines (p53, E2F1, CREB, JUN, E1A, Antigène T de SV40, pCAF, MyoD, FOS, p73,...). Le bromodomaine permet l'interaction avec les lysines

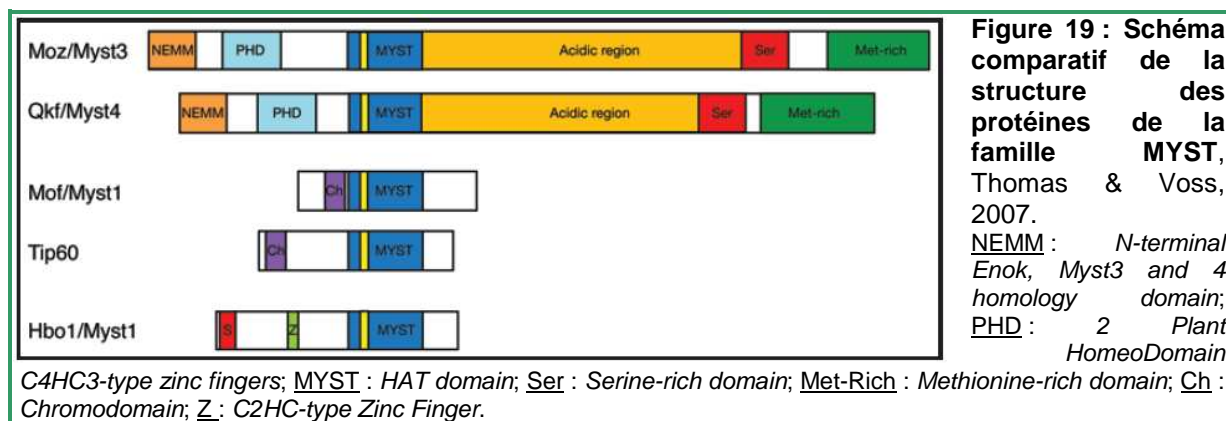
acétylées. Les régions amino- et carboxy-terminales des deux protéines, quant à elles, servent à activer la transcription [Chan & La Thangue, 2001]. Les substrats reconnus par CBP et p300 possèdent systématiquement trois ou quatre acides aminés basiques de chaque côté de la lysine cible [Marmostein & Trievel, 2009]. Pour ces deux protéines, il existe un inhibiteur compétitif commun, qui est la lysine coenzyme A (LysCoA), ce qui complique la discrimination fonctionnelle des deux protéines [Lau et al, 2000].



3. Les autres familles de HATs

Contrairement aux familles de HATs GNAT et CBP/p300, aucune autre famille de HAT n'a été identifiée chez le schistosome.

→ **MYST** est la plus grande famille de HAT recensée. Les membres (MOZ, YBF-2/SAS3, SAS2 et TIP60) possèdent des rôles dans de nombreuses fonctions biologiques, telles que le *gene silencing*, l'apoptose, le cycle cellulaire, l'homéostasie des cellules souches et dans le *X chromosome dosage compensation* chez la drosophile. Chez les mammifères cinq protéines ont été identifiées comme appartenant à cette famille et peuvent être regroupées en trois sous-familles : (1) MOZ (*monocytic leukemia zinc finger protein*) et QKF (*Querkopf*), (2) MOF (*MOZ-related Factors*) et TIP60 (*HIV Tat-interacting protein of 60 kDa*), et (3) HBO1 (*HAT Bound to Original Recognition Complex*). L'existence de paires de coactivateurs extrêmement similaires est fréquente chez les protéines impliquées dans la régulation transcriptionnelle chez les mammifères (par exemple CBP et p300) [Thomas & Voss, 2007]. Les protéines de la famille MYST sont définies par un domaine HAT fortement conservé d'environ 250 acides aminés, appelé domaine MYST (**Figure 19**). Il contient un domaine en doigts de zinc atypique (C2HC) ainsi que le site d'interaction avec l'AcCoA. Selon la sous-famille de protéine, le chromodomaine lorsqu'il est présent, se situe dans la région amino-terminale et est impliqué dans l'interaction avec les facteurs de remodelage de la chromatine et avec l'ARN. Le domaine PHD permet l'interaction avec d'autres protéines, tout comme le domaine Ser ; le domaine riche en méthionines interagit avec les peptides signaux d'autres protéines et permet leur exclusion nucléaire et les doigts de zinc sont impliqués dans l'interaction avec l'ADN [Thomas & Voss, 2007].

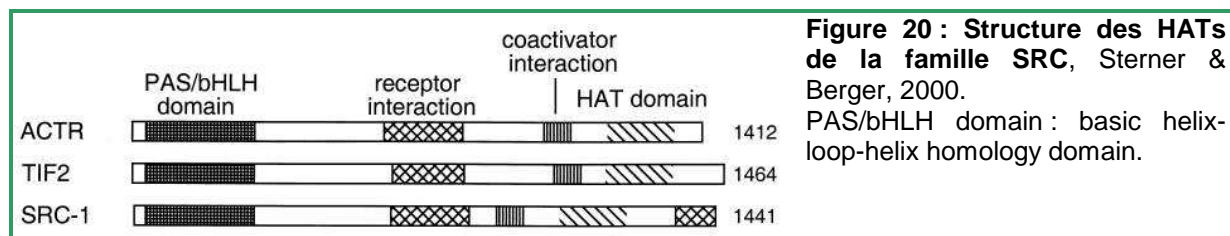


→ **RTT109** n'est présente que chez les champignons comme un *budding yeast regulator of Ty1 transposition* et comme étant impliquée dans la réponse aux dommages de l'ADN dus aux agents génotoxiques. Plus récemment il a été montré que RTT109 favorise la stabilité génomique. Elle a la capacité d'acétyler directement la lysine 56 de l'histone H3 durant la phase S [Marmorstein & Trievel, 2009]. RTT109 n'a pas d'homologie de séquence avec les autres HATs, cependant elle a une très grande similarité de structure avec p300, car elle contient au centre sept feuillets β isolés entourés par des hélices. Tout comme p300, RTT109 a la capacité de s'auto-acétyler pour s'activer, mais cette acétylation n'est pas essentielle pour l'acétylation de H3K56 mais pour l'acétylation d'autres substrats [Thompson et al, 2004]. RTT109 interagit avec deux protéines histones chaperones, Asf1 et Vps75. ; Cette interaction est essentielle pour que RTT109 interagisse avec d'autres protéines, car elle ne contient pas de domaine permettant de telles interactions [Marmorstein & Trievel, 2009].

→ **TAFII 250** (*TATA binding protein Associated factor IID*) est une sous-unité de TFIID, impliquée dans la première étape de l'initiation de la transcription ARN polymérase II dépendante. Cette HAT acétyle les histones H2A, H3 et H4 grâce à son domaine central, qui permet également la liaison à l'Acétyl-CoA grâce au motif Gly-X-Gly (**Figure 17**). Ce domaine n'est que très peu conservé par rapport aux autres HATs connues, ce qui fait de TAFII 250 la seule composante de la famille [Sternier & Berger, 2000]. Elle possède un domaine kinase qui lui permet de s'autophosphoryler mais également de phosphoryler la grande sous-unité du facteur de transcription TFIIF. Dans la région carboxy-terminale elle possède un double bromodomaine non essentiel pour l'activité enzymatique [O'Brien & Tjian, 2000].

→ La famille **SRC** (*Steroid Receptor Coactivator*) est constituée de coactivateurs de récepteurs nucléaires qui interagissent avec les récepteurs nucléaires hormonaux. SRC-1 (également nommée p160) qui interagit avec de nombreux récepteurs aux hormones, tels que le récepteur à la progestérone (PR), aux glucocorticoïdes (GR), aux oestrogènes (ER),

aux hormones thyroïdiennes (TR) et à l'acide rétinoïque (RAR). SRC1 acétyle les histones H3 et H4 grâce à son domaine HAT situé en région carboxy-terminale (**Figure 20**). SRC-1 interagit avec CBP/p300 et PCAF, ce qui indique que plusieurs HATs sont nécessaires pour la régulation de la transcription induite par les hormones. De plus SRC-1 est acétylée par CBP [Sterner & Berger, 2000].



→ **ATF-2** est une *DNA-binding protein* qui se lie aux *cAMP-response elements* (CREs) pour former un hétérodimère avec c-Jun, grâce à un motif Leucine-Zip en région carboxy-terminale (**Figure 17**). Ceci permet la stimulation de l'expression de la transcription dépendant de Cre [Kawasaki et al, 2000 (1)]. ATF-2 est la seule HAT qui a la capacité de reconnaître spécifiquement une séquence nucléique et de s'y fixer. L'activité désacétylase d'ATF-2 est contrôlée par la phosphorylation [Kawasaki et al, 2000 (2)].

Les complexes contenant les protéines à activité HAT se lient à l'ADN par l'intermédiaire d'activateurs transcriptionnels, au niveau d'éléments UAS (*Upstream Activating Sequence*). De plus, parallèlement à ces facteurs, certaines modifications épigénétiques des histones, autres que l'acétylation, sont parfois nécessaires pour le recrutement des complexes HATs. Par exemple, la sous-unité Chd1 appartenant aux complexes SAGA et SILK reconnaît H3K4 méthylée grâce à son chromodomaine [Pray-Grant et al, 2005]. Une fois fixée au niveau d'un gène actif, une HAT est maintenue en place seule ou grâce aux recrutements d'autres HATs, qui contiennent un bromodomaine permettant de lier les lysines acétylées. Cette fixation maintient un certain niveau d'acétylation. Par exemple, Gcn5 lie H4K16 acétylée, ce qui permet de recruter le complexe SAGA [Owen et al, 2000].

La régulation sélective existant grâce aux HATs est déterminée par les différents sites où sont recrutées les enzymes, par la nature de la chromatine et par l'état des modifications des histones.

b. HDACs

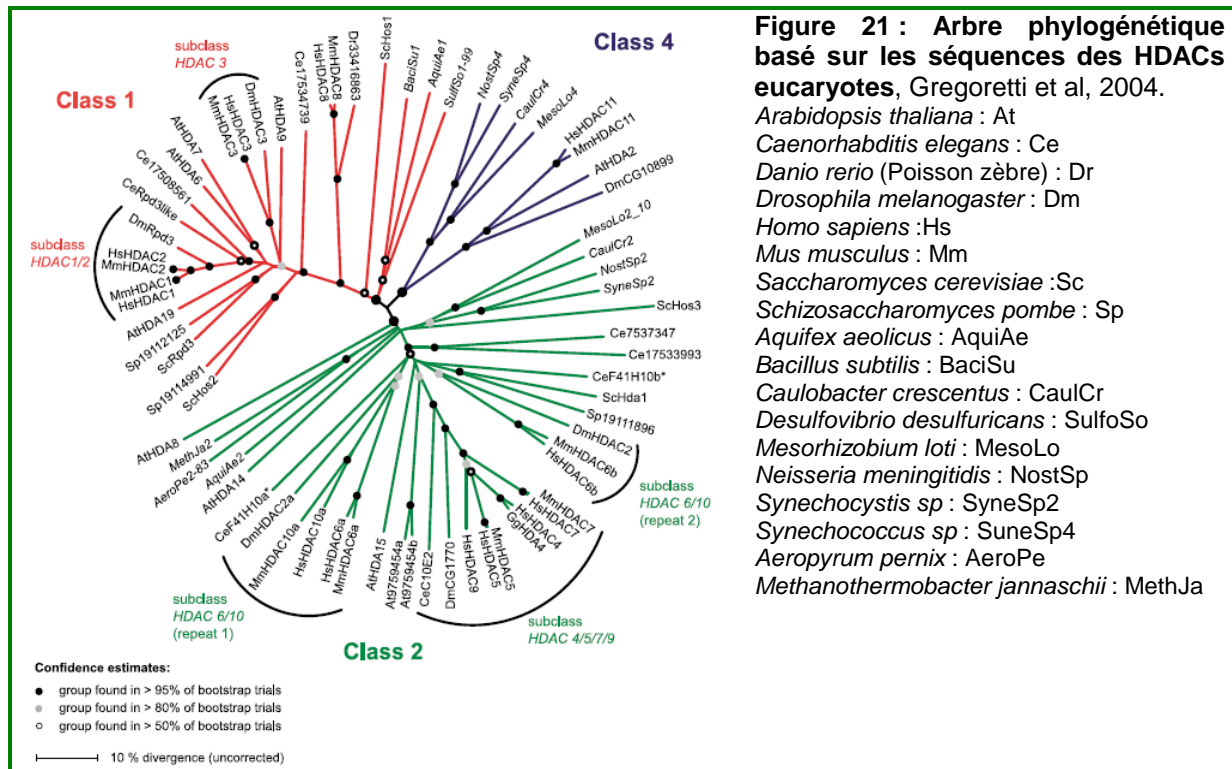
Afin de contre balancer l'activité des HATs, des HDACs désacétylent les lysines acétylées. Elles établissent et maintiennent la répression génique, de façon gène-spécifique,

mais également plus globalement à travers le génome. La machinerie acétylation/désacétylation est un mécanisme hautement dynamique, qui définit le taux de transcription. En effet, un niveau élevé d'acétylation ne définit en lui-même un taux de transcription important, mais c'est plutôt un haut niveau d'acétylation couplé à une désacétylation rapide. Au niveau des régions transcriptionnellement actives, un fort *turnover* acétylation/désacétylation est observé alors que dans les régions plus faiblement transcrites, la désacétylation se fait plus lentement après l'acétylation. L'acétylation est globalement élevée au niveau des gènes actifs, l'activité HAT étant plus importante que l'activité HDAC, la balance penche donc pour un état acétylé des gènes fortement exprimés [Shahbazian & Grunstein, 2007]. La désacétylation, en elle-même, permet d'établir et de maintenir une répression génique, puisqu'elle entraîne une condensation de la chromatine, ce qui la rend moins accessible aux facteurs de transcription et aux machineries transcriptionnelles.

1. Phylogénie des HDACs

Les HDACs sont des enzymes anciennes, extrêmement bien conservées à travers le règne du vivant puisqu'elles sont retrouvées chez les eucaryotes comme les procaryotes. Ces sont des enzymes plus anciennes que leur substrat préférentiel, les histones. En effet, elles ont été mises en évidence chez les bactéries qui ne possèdent pourtant pas d'histone (mais des protéines basiques, appelées *histone-like*). En 1996, Taunton et al ont purifié la première HDAC, HDAC1, à partir d'un extrait protéique bovin et d'une colonne d'affinité couplée à un inhibiteur de HDACs, la trapoxine. C'est l'orthologue de Rpd3 de levure. Des études précédentes sur Rpd3 ont montré son implication dans la régulation génique globale [Vidal & Gaber, 1991], l'importante similarité de séquence entre les deux protéines a permis de faire le lien entre l'acétylation des histones et la régulation génique. Par la suite de nombreuses autres HDACs ont été identifiées et grâce aux données structurales et aux homologies avec les protéines de levure, une classification est établie (**Figure 21**). Il existe deux grandes catégories de HDACs, définies par le cofacteur essentiel à leur activité. Un groupe de HDACs voit son activité dépendante d'un ion zinc. On retrouve dans cette catégorie trois classes d'enzymes, la classe I (ou Rpd3-like (*Reduced Potassium Dependency* -3)), la classe II (ou Hda1-like (*Histone Deacetylase 1*)) [de Ruijter et al, 2003] et la classe IV qui ne comporte qu'un seul membre HDAC11 [Gao et al, 2002]. L'autre groupe des HDACs est dépendant du nicotinamide adénine dinucléotide, ou NAD⁺. Cette catégorie d'enzyme définit à elle seule la classe III (ou Sir2-like) des HDACs [Braunstein et al, 1993]. L'importante conservation des HDACs au cours de l'évolution confirme leur rôle essentiel dans des mécanismes cellulaires ancestraux (**Figure 21**). Cependant la duplication importante de gènes codants des HDACs chez l'Homme ; 11 gènes distincts pour les

classes I et II, a probablement contribué à l'acquisition de nouvelles fonctions ou des spécificités de fonction.



2. HDACs Zn^{2+} -dépendantes

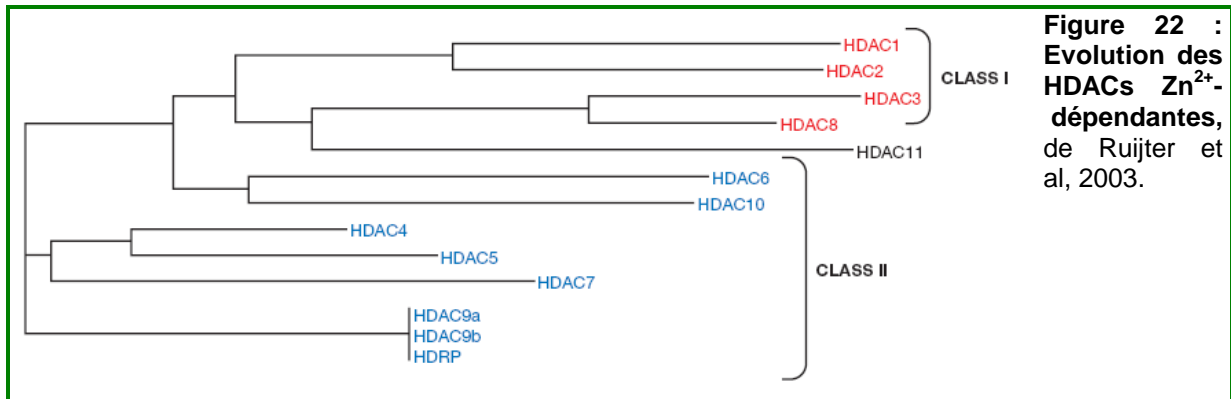
→ Mode d'action

Conservé parmi les différentes espèces, le domaine catalytique des HDACs est formé d'environ 390 acides aminés. Le site actif est constitué d'une poche tubulaire courbée [Finnin et al, 1999]. Le retrait du groupement acétyle s'opère via un système de transfert de charge constitué de deux histidines adjacentes, deux acides aspartiques et d'une tyrosine [Buggy et al, 2000 ; Finnin et al, 1999]. Le composant essentiel du système de transfert de charge est la présence d'un ion zinc (Zn^{2+}). Le site de fixation de cet ion se trouve au bout de la poche catalytique. Les travaux de Finnin en 1999 ont proposé le mécanisme d'action à la suite de la cristallisation du domaine catalytique et d'un homologue d'une HDAC chez la bactérie thermophile *Aquifex aeolicus* avec des inhibiteurs comme la trichostatine A (TSA) ou l'acide hydroxamique suberoylanilide (SAHA).

Par ailleurs, l'activité enzymatique des enzymes HDACs produites sous forme de protéines recombinantes est souvent très faible voire nulle, indiquant que d'autres partenaires cellulaires sont requis pour une conformation et une efficacité enzymatique. Cette observation est confirmée par l'analyse des structures cristallographiques des enzymes bactériennes qui suggère que l'environnement du site catalytique pourrait

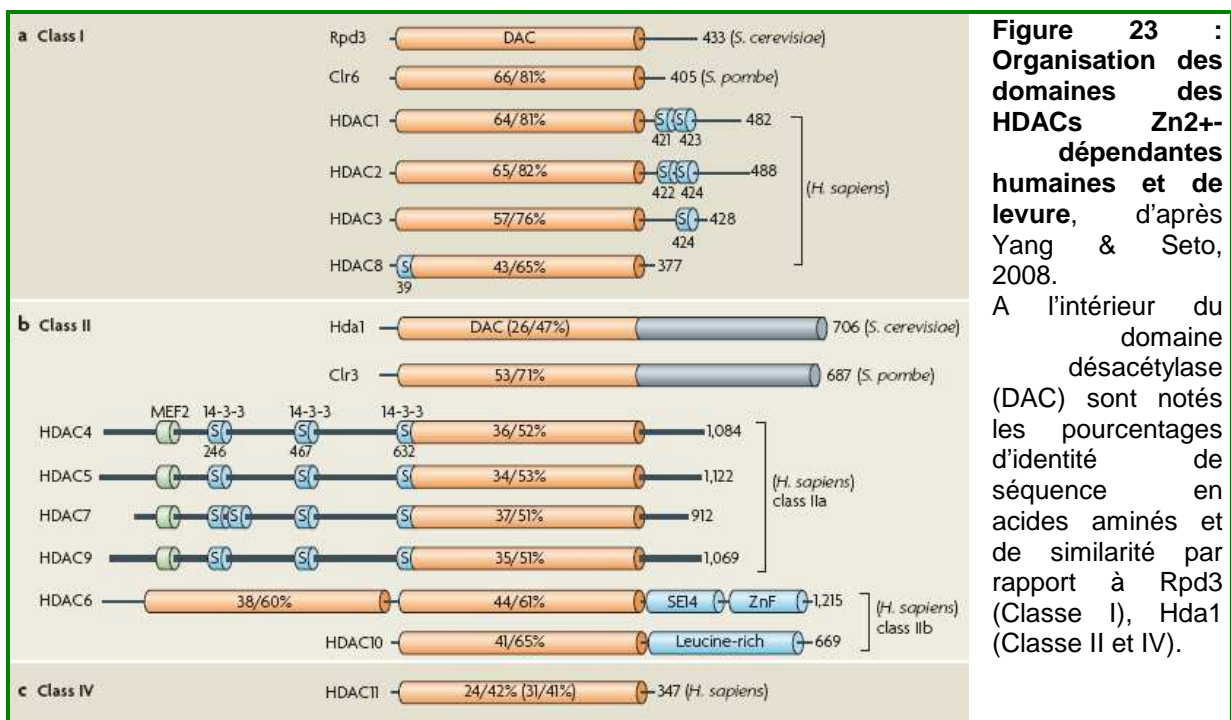
constituer autant de surfaces d'interaction protéine/protéine différentes, à l'exception d'HDAC8.

Parmi la famille de HDACs dites « classiques », l'organisation en trois familles de toutes les enzymes s'est faite sur des critères d'identité de séquences (**Figure 22**). En outre cette classification a révélé que les protéines d'une même classe pouvaient partager davantage que des homologues de séquence, telles que des ressemblances au niveau de leur fonction ou de leur localisation.



→ **Classe I**

La protéine qui sert de modèle pour la classe I de HDACs est Rpd3 de levure (**Figure 22**). Elle comporte un domaine en région amino-terminale qui possède l'activité désacétylase. Toutes les protéines appartenant à cette famille présentent la même structure de base. Chez les mammifères, quatre membres constituent cette classe : HDAC1, 2, 3 et 8.



- **HDAC1 et 2** sont deux protéines extrêmement proches, car elles possèdent une identité de séquence avoisinant les 82%. Leur activité enzymatique est maximale lorsqu'elles font partie de complexes, tels que Sin3, NuRD et Co-REST. Elles peuvent également lier directement des protéines de liaison à l'ADN telles que YY1 (*Yin and Yang 1*) [Yao et al, 2001], ou la protéine du rétinoblastome Rb [Magnaghi-Jaulin et al, 1998]. HDAC1 a la capacité de former des homodimères ainsi qu'un hétérodimère avec HDAC2, grâce à leurs domaines *coiled-coil* en région amino-terminale [Gregoretto et al, 2004]. Toutes deux sont la cible de modifications post-traductionnelles qui régulent fortement leur activité. En effet, une hyperphosphorylation par la kinase CK-2 (*Casein Kinase-2*) au niveau de leur extension carboxy-terminale aboutit à une augmentation de l'activité désacétylase. *In vivo*, HDAC1 et 2 sont phosphorylées à un faible niveau, mais c'est essentiel à leur activité et notamment à la formation des complexes dans lesquels elles sont impliquées [de Ruijter et al, 2003].

- **HDAC3** diffère légèrement de HDAC1 et 2 car elle ne possède qu'un seul site de phosphorylation par CK2 [Zhang et al, 2005] (**Figure 23**). Elle est également phosphorylée par la protéine à activité tyrosine kinase SRC lors de leur interaction, ce qui pourrait constituer un mode de régulation original parmi les HDACs [Longworth et al, 2006]. HDAC1, 2 et 3 fonctionnent globalement de la même façon, car HDAC2 est elle aussi active uniquement lorsqu'elle est impliquée dans un complexe (SMRT (*Silencing Mediator for Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptors*) et N-CoR (*Nuclear Receptor Co-Repressor*)). De plus HDAC3 possède la capacité de s'homodimériser ainsi que de former des hétérodimères avec HDAC4 [de Ruijter et al, 2003].

- **HDAC8** est la dernière HDAC de classe I identifiée [Buggy et al, 2000]. Elle est la plus similaire à HDAC3 (34% d'identité), cependant elle a une structure légèrement différente car elle n'est constituée quasiment que du domaine catalytique (**Figure 23**). De plus, contrairement aux autres HDACs de classe I, II et IV, HDAC8 peut lier indifféremment le Zn^{2+} et le Fe^{2+} [Gantt et al, 2006]. A l'inverse des autres HDACs, HDAC8 peut fonctionner seule [de Ruijter et al, 2003] et sa phosphorylation (par la protéine kinase A et non plus CK-2) réprime son activité désacétylase [Yang & Seto, 2008].

Toutes les HDACs de classe I montrent une activité désacétylase qui cible principalement les protéines nucléaires, ce qui corrèle avec leur localisation et le domaine NLS qu'elles possèdent. En effet HDAC1 et 2 sont exclusivement nucléaires, quant à HDAC3 elle possède un NLS (*Nuclear Localization Sequence*) et un NES (*Nuclear Export Sequence*), ce qui suppose une translocation possible vers le cytoplasme bien qu'elle soit principalement nucléaire. L'étude de la localisation d'HDAC8 est rendue difficile par son faible taux d'expression, cependant sa surexpression démontre également une localisation nucléaire [Van den Wyngaert et al, 2000].

→ **Classe II**

Les protéines les plus fortement homologues à Hda1 de levure sont regroupées dans la classe II de HDACs, qui est elle-même divisée en deux sous-classes : IIa et IIb (**Figure 23**). L'organisation structurale de cette classe de protéines est constituée d'un large domaine catalytique et d'une longue extension dont la fonction est inconnue. La particularité des membres de la sous-classe IIb est qu'ils possèdent plus d'un domaine HDAC. Leur expression est plus restreinte que celle des membres de la classe I, suggérant des rôles plus spécifiques dans les phénomènes de différenciation et de développement [Buggy et al, 2000 ; Galasinski et al, 2002].

- **Sous-classe IIa : HDAC4, 5, 7 et 9.** Ce sont des protéines dont la fonction n'est pas ubiquitaire, elles interviennent à différents stades au cours de la différenciation de la cellule musculaire. Le domaine catalytique est situé du côté carboxy-terminal, un domaine NLS est situé dans la région amino-terminale ainsi que de nombreux domaines d'interactions avec d'autres protéines (**Figure 23**). Par exemple, HDAC4, 5 et 7 interagissent avec la HAT CBP, avec MEF2 (*Myocyte Enhancer Factor 2*) et 14-3-3. HDAC9 est légèrement différente des autres HDACs de classe II car elle porte le domaine catalytique du côté amino-terminal, comme les HDACs de classe I. Il existe trois variants de HDAC9 répertoriés, HDAC9a, HDAC9b et HDRP/HDAC9c (qui est déficient pour l'activité désacétylase). HDAC4, 5, 7 et HDAC9c s'associent à HDAC3 afin de recruter le complexe SMRT/N-CoR dans le noyau. Ces protéines peuvent avoir dans certains cas une localisation cytoplasmique et ne sont donc pas strictement nucléaires. HDAC4 et HDAC5 notamment semblent capables de se déplacer entre le cytoplasme et le noyau grâce à leur domaine NES au cours des processus de prolifération et différenciation musculaires d'une part [Miska et al, 1999], et en réponse à l'activité synaptique des neurones d'autre part [Chawla et al, 2003]. HDAC7, bien que ne possédant pas de NES, migre du cytoplasme vers le noyau durant la différenciation des cellules musculaires. Sa localisation semblerait être dépendante de l'expression des protéines CaMK et 14-3-3 [de Ruijter et al, 2003]. HDAC 4, 5 et 7 sont capables de réprimer l'activité du facteur de transcription MEF-2, bloquant ainsi la différenciation musculaire. Ce blocage peut être levé par la phosphorylation des HDACs par l'activité CamK [McKinsey et al, 2000]. La localisation sub-cellulaire de ces trois HDACs diffère au cours de la différenciation musculaire, suggérant un mécanisme particulier de régulation de l'expression des gènes durant ce processus [Kao et al, 2001 ; Wu et al, 2001]. HDAC 9 est également capable d'interagir avec MEF-2 et, dans le muscle adulte, permettrait le maintien d'un programme génétique de myotubes différenciés en réponse à la stimulation électrique exercée par les motoneurones [Mejat et al, 2005].

▪ **Sous-classe IIb : HDAC6 et 10.** HDAC6 possède une répétition en tandem du domaine catalytique du côté amino-terminal de la protéine (**Figure 23**). HDAC10, quant à elle, possède un domaine catalytique complet et un vestige d'une deuxième copie du domaine. Il semblerait que HDAC10 serait issue de l'évolution d'une protéine HDAC6-like [Guardiola & Yao, 2002]. L'évolution entre les branches HDAC6 et HDAC10 a été rapide, ce qui suggère une divergence fonctionnelle entre les deux protéines [Gregoretti et al, 2004]. En effet HDAC6 est localisée principalement dans le cytoplasme et interagit avec HDAC11, elle contrôle la mobilité cellulaire dépendante des microtubules [Hubbert et al, 2002]. En revanche HDAC10 est nucléaire et interagit avec HDAC1, 2, 3, 4, 5 et 7, SMRT, comme la majorité des HDACs de classe II, mais également Rb, ce qui suggère son implication dans la régulation du cycle cellulaire [de Ruijter et al, 2003].

→ **Classe IV**

HDAC11 est l'unique membre de la classe IV, elle présente des similarités relatives avec les classe I et II. Son domaine catalytique est situé en région amino-terminale (**Figure 23**) et ne semble être impliqué dans aucun complexe protéique, ce qui distinguerait HDAC11, sur le plan biochimique, des autres HDACs. Sa localisation est exclusivement nucléaire, et son production est restreinte à certains tissus (rein, coeur, cerveau, muscle squelettique et testicule) chez l'Homme [Gao et al, 2002]. On la retrouve aussi chez *C. elegans*, *D. melanogaster*, les bactéries et les plantes [Yang & Seto, 2008].

Les HDACs n'ont pas la capacité de se fixer directement sur les régions promotrices de l'ADN où elles doivent intervenir et réprimer la transcription. Pour cela, l'implication d'autres protéines ou complexes est essentielle. Les HDACs peuvent directement interagir avec des protéines se liant à l'ADN, telle que YY1 et HDAC1 ou encore MEF2 et HDAC4, 5, 7 et 9. Les HDACs peuvent également être prises en charge par des complexes multiprotéiques, lesquels sont souvent essentiels à l'activité désacétylase des HDACs (**Figure 24**). Le complexe Sin3 est composé des protéines Sin3A/B qui permettent de recruter les autres acteurs du complexe tels que HDAC1 et 2, RbAp48 (qui se lie aux histones) ainsi que SAP18 et 30 (qui stabilisent l'ensemble). Il interagit avec les facteurs de transcription, ce qui permet de cibler l'activité désacétylase des HDACs [Cunliffe, 2008]. Le complexe de remodelage NuRD est également constitué des HDAC1 et 2. Les sous-unités RbAp46/48 sont également retrouvées au sein du complexe, ainsi que MBD3 et les protéines à domaine SANT MTA1 et 2 [Cunliffe, 2008]. CoREST est recruté par la protéine à doigts de zinc REST au niveau des promoteurs de gènes neuronaux, *via* la protéine RE1. Les complexes contenant NCoR et SMRT sont composés de nombreuses sous-unités

protéiques variables, dont les HDACs de classe I et II. Chez les mammifères et la drosophile ils régulent le recrutement et la différenciation des progéniteurs neuraux [Cunliffe, 2008]. Ces deux complexes jouent des rôles fondamentaux au cours du développement, de la différenciation et de la tumorigénèse, grâce à la capacité qu'ils ont à activer la répression de la transcription suite au recrutement de différents facteurs [Li et al, 2000].

Complex	<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	Vertebrates
Sin3	HDA-1 RBA-1, LIN-53 SIN-3 MAB-21	RPD3 p55 Sin3 <i>mab-21</i> Sds3 <i>Bin1</i>	HDAC1, HDAC2 RbAp46, RbAp48 Sin3A mab21L1, mab21L2 Sds3, BRMS1 RBP1 SAP18 SAP30 ING1/2
MI2/NuRD	HDA-1 RBA-1, LIN-53 LET-418, CHD-3	RPD3 p55 Mi-2 Atrophin? MBD2/3 p66 <i>CG1244</i>	HDAC1, HDAC2 RbAp46, RbAp48 Mi-2 α , Mi-2 β MTA1, MTA-2, Atrophin-2? MBD3 p66 α , p66 β
CoREST	HDA-1 SPR-1 SPR-5 SPR-3, SPR-4 <i>DIN-1</i>	RPD3 CoREST Hdm REST Spen	HDAC1, HDAC2 CoREST LSD1 SHARP BHC80 SIN3
SMRT/NCOR		HDAC3 SMRTER Ebi	HDAC3 SMRT/NCOR TBL1, TBL1R GPS2 JMJD2A

Figure 24 : Composants des principaux complexes répresseurs de la transcription impliquant des HDACs, Cunliffe, 2008.

→ Cancer et développement d'inhibiteurs

Les HDACs ont un rôle extrêmement important dans la régulation de l'expression au sein des cellules eucaryotes, dans différents processus cellulaires, comme l'angiogénèse, l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation cellulaire... Le recrutement inapproprié des HDACs contribue au développement de cancers. C'est pourquoi l'étude des inhibiteurs de HDACs (HDACi) propose des perspectives prometteuses quant au développement de futurs agents anti-tumoraux et traitements contre le cancer [Kim et al, 2006 ; Riester et al, 2007].

Actuellement un grand nombre d'inhibiteurs de HDACs a déjà été mis en évidence, tant naturels que synthétiques. Ils peuvent être à large spectre, c'est-à-dire cibler toutes les

HDACs Zn²⁺-dépendantes, ou spécifiques d'une classe ou d'une HDAC [Balasubramanian et al, 2009]. Leur mode d'action est similaire pour la majorité des inhibiteurs connus actuellement, ils se lient au niveau du site actif de l'enzyme. Dans cette poche, leur association avec le zinc est essentielle pour les échanges de charges et leur activité inhibitrice [Finnin et al, 1999]. C'est vraisemblablement une des raisons pour lesquelles la plupart des HDACi inhibent les HDAC de classes I et II Zn²⁺-dépendantes et sont inefficaces sur les enzymes de classe III NAD⁺-dépendantes. En terme de thérapeutique, les HDACi à large spectre soulèvent le problème des effets secondaires et indésirables. Outre le fait qu'ils peuvent réprimer une HDAC impliquée dans le développement du cancer, la répression des autres enzymes peut engendrer de nombreux effets toxiques, lesquels pourront potentiellement diminuer voir disparaître avec le développement et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la HDAC à l'origine de la maladie [Balasubramanian et al, 2009]. C'est pourquoi il est important d'approfondir les connaissances actuelles sur la biologie et la structure des différents isoformes.

Les HDACi naturels, comme la trichostatine A (TSA), l'acide suberoylanilide hydroxamique (SAHA), le butyrate de sodium ou le phénylbutyrate, présentent une activité *in vivo* mais leur développement est limité par leur instabilité et leur faible rétention. C'est pour cette raison que des analogues ont été synthétisés et découverts à partir de nouvelles banques. L'oxamflatine et le scriptaide, qui ont des structures proches de celles de la TSA et du SAHA, ont ainsi été développés. De là est née une seconde génération d'HDACi avec le LAQ824 ou encore le PDX101 dont le développement est actuellement en phase d'essais cliniques [Balasubramanian et al, 2009]. Des nouveaux dérivés benzamides ont été simultanément synthétisés et deux d'entre eux sont avancés dans les essais cliniques, le MS-275 et le CI-994. Les HDACi étudiés à l'heure actuelle ont une structure biochimique fortement hétérogène, c'est pourquoi ils sont classés en plusieurs groupes.

- **Les dérivés d'acide aliphatique** : tels que l'acide valproïque (VPA) et le butyrate de sodium, ont un faible potentiel car la courte taille de leur chaîne limite les contacts avec la poche catalytique des HDACs. Ils inhibent les HDACs de classe I et IIa. Le VPA est à l'origine utilisé contre les convulsions, il inhibe l'activité désacétylase des HDACs et induit spécifiquement la dégradation de HDAC2 [Kim et al, 2006].

- **Les acides hydroxamiques** : sont les inhibiteurs de HDACs les plus communs, ils sont efficaces sur les classes I et II de HDACs. La trichostatine A (TSA) , un antibiotique antifongique à l'origine, est l'inhibiteur de HDACs de référence. Bien qu'il n'ait jamais progressé comme candidat clinique, il a été un outil majeur dans la validation des HDACs comme des cibles anticancéreuses. Sa toxicité et sa faible biodisponibilité ont poussé la découverte de nouvelles molécules, telles que LAQ824 ou PDX101 qui font l'objet d'essais cliniques [Kim et al, 2006]. Le SAHA (ou vorinostat) est l'inhibiteur le plus prometteur à

l'heure actuelle. C'est un inhibiteur de croissance de nombreux types cellulaires transformés *in vitro* à des niveaux de dosage où la toxicité est minimale. Alors que le SAHA montre un potentiel de répression moyen, d'autres inhibiteurs avec un potentiel répresseur plus important montrent une toxicité plus élevée [Marks & Breslow, 2007].

- **Les peptides cycliques** : La trapoxine et la dépodécine inhibent les HDACs en se liant de manière irréversible au niveau du site de liaison du Zn^{2+} . L'apicidine est un métabolite d'origine fongique qui a montré des capacités anti-tumorales grâce à l'induction de p21 et du gène supresseur de tumeur *gelsolin* (qui encode une protéine se liant à l'actine). Le depsipeptide dérivé de *Chromobacterium* a également prouvé son efficacité anti-tumorale, il est efficace contre HDAC1 et 2 [Kim et al, 2006].

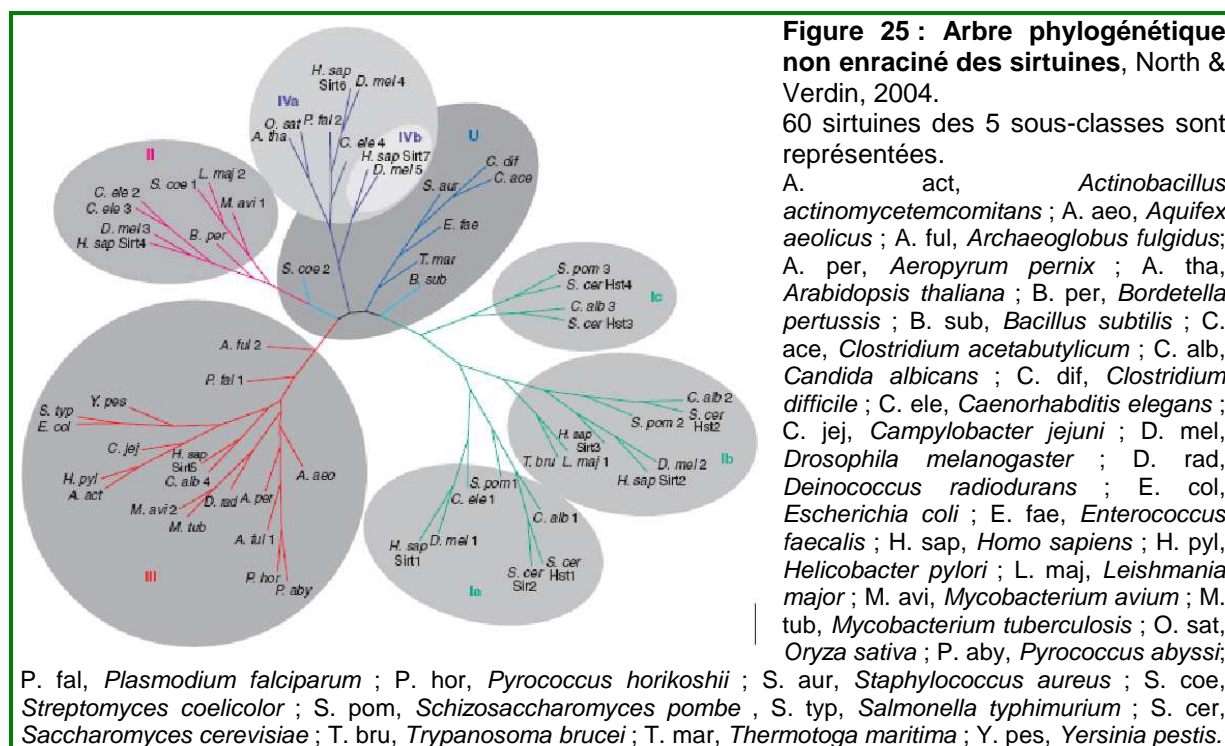
- **Les dérivés de la benzamide** : tels que CI-994 et MS-275 (carbamate pyridyl synthétique), sont en général moins actifs que les acides hydroxamiques ou les peptides cycliques, et répriment les HDACs à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Cependant l'avantage de ces composés est qu'ils ont de meilleures propriétés physico-chimiques que la TSA. MS-275 entraîne une expression favorisant l'arrêt de la croissance et la différenciation, en activant significativement des gènes anti-prolifératifs tels que p21. CI-994 n'inhibe pas l'activité HDAC directement mais a prouvé son efficacité dans les tumeurs chez la souris, contrairement à la majorité des inhibiteurs étudiés jusqu'à présent [Kim et al, 2006].

L'efficacité des HDACi à cibler les cellules cancéreuses est un atout très important pour la mise au point de nouvelles chimiothérapies. En effet les HDACi ont la capacité d'induire l'apoptose au sein des cellules cancéreuses et non au sein des cellules saines. Lors du développement d'une tumeur, les HDACs répriment les voies de signalisation impliquées dans la croissance et la différenciation cellulaire, ainsi que l'action des protéines codées par les gènes supresseurs de tumeurs. En présence de HDACi, ces voies sont réactivées et ce qui met en place une réponse anti-tumorale dépendante du facteur induisant la mort cellulaire TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) [Nebbioso et al, 2005]. En parallèle les travaux de Ungerstedt montrent que les HDACi induisent une augmentation du taux de thioredoxine réduite dans les cellules non cancéreuses, ce qui permet l'élimination des radicaux libres. Dans les cellules cancéreuses, les HDACi induisent la liaison de la thioredoxine à la protéine TBP2 (*Thioredoxine Binding Protein*), son activation et l'induction de la mort cellulaire [Ungerstedt et al, 2005]. Ces deux voies de mise en place de l'apoptose spécifiques des cellules cancéreuses confirment l'efficacité des HDACi comme thérapie potentielle.

De plus l'utilisation combinée de HDACi avec d'autres médicaments est également très prometteuse. Celle-ci permet de traiter les patients avec les concentrations minimales de médicaments, ce qui permet de limiter les effets secondaires indésirables.

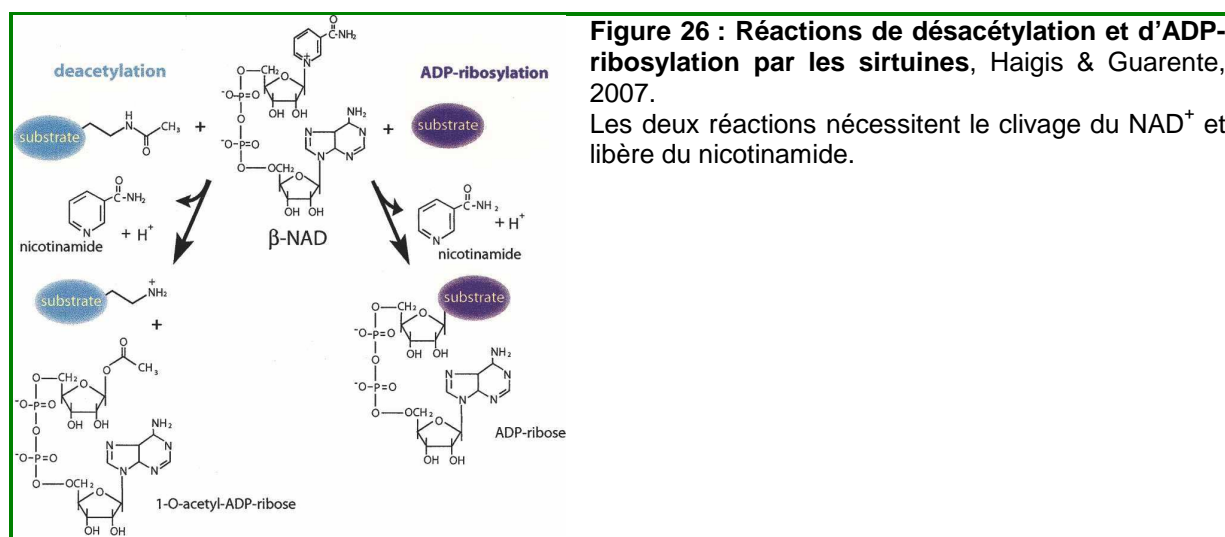
3. HDACs NAD⁺-dépendantes, classe III

La classe III des HDACs regroupe les homologues de la protéine de levure Sir2 (*Silent Information Regulator 2*). Les membres de cette classe, les sirtuines, sont retrouvés chez les eucaryotes, mais également chez les procaryotes et les archées. Selon les organismes, un nombre variable de sirtuines peut être identifié, lesquelles ont été organisées en cinq sous-classes, nommées de I à IV et la sous-classe U (composée uniquement de protéines issues de bactéries gram positif) [North & Verdin, 2004] (**Figure 25**).



Chez *S. cerevisiae*, cinq sirtuines sont connues : Sir2 et Hst1 à 4 ; chez la drosophile également alors que chez l'Homme sept membres sont répertoriés (Sirt1 à 7) [Blander & Guarente, 2004]. Ces enzymes requièrent un cofacteur, le NAD⁺, et sont insensibles à la trichostatine A [Yoshida et al, 1990]. Elles peuvent être considérées comme des senseurs métaboliques du taux de NAD⁺/NADH présent dans la cellule, ce qui leur permet de moduler alors l'expression de gènes selon l'état métabolique de la cellule [Canto & Auwerx, 2009]. Elles ont une structure bilobée, avec deux domaines globulaires, un grand et un petit. Le grand domaine est impliqué dans l'interaction avec le cofacteur, alors que le petit domaine semblerait être davantage important pour la reconnaissance du substrat. La poche

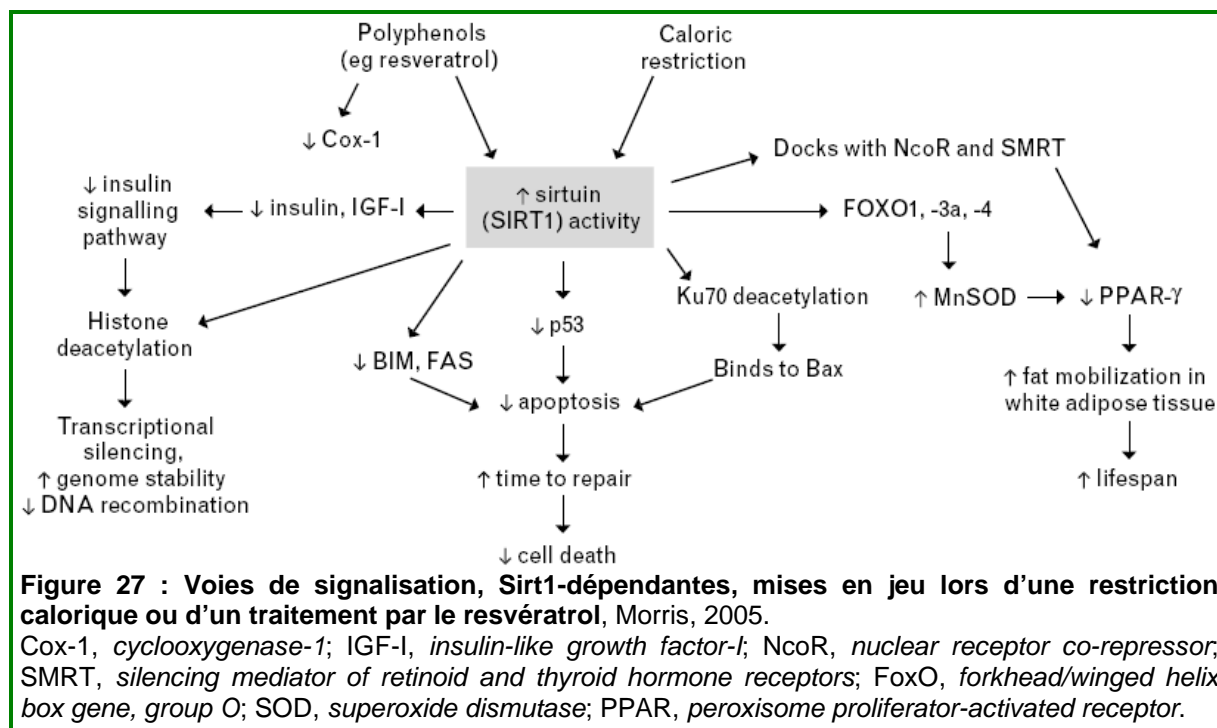
permettant la liaison avec le NAD^+ au sein du grand domaine est divisible en trois sites. Un premier, site A, où se lie l'adénine ribose du NAD^+ . Le site B où se lie le nicotinamide ribose et le site C dans le fond de la poche. Les sites B et C sont impliqués dans la catalyse. En présence d'une lysine acétylée, le NAD^+ se lie au niveau du site B, ce qui entraîne un changement de conformation et le cofacteur se rapproche alors du site C où il est clivé, ce qui entraîne la libération d'ADP ribose et de nicotinamide. Lorsque la concentration en nicotinamide est trop importante, où celui-ci se met au niveau du site C, ce qui bloque le changement de conformation et empêche la réaction [North & Verdin, 2004]. Bien que les sirtuines possèdent une activité HDAC, elles ont initialement été identifiées comme des ADP-ribosyltransférases chez la bactérie *Salmonella typhimurium* [Tsang & Escalante-Semerena, 1996]. Les sirtuines ont pour substrat une histone ou autre protéine acétylée, la réaction se fait en présence de NAD^+ et génère trois produits, l'acétyl-ADP ribose, le nicotinamide et la protéine désacétylée (**Figure 26**).



Les sirtuines ne possèdent pas une expression ubiquitaire et voient leur localisation sub-cellulaire varier selon le type de sirtuine, et sont donc impliquées dans la régulation de différents mécanismes. Chez la levure, Sir2 a un rôle dans de nombreux processus : la répression de la transcription au niveau des télomères, le *silencing* au niveau des gènes de *mating-type* et de l'ADN ribosomal, la réparation des cassures de l'ADN, la progression du cycle cellulaire, la stabilité chromosomique et des mécanismes moléculaires impliqués dans la longévité [North & Verdin, 2004]. Cette protéine est nucléaire, tout comme son orthologue Sirt1 chez l'Homme. Cette dernière est retrouvée complexée avec la HAT PCAF et le facteur de transcription MyoD et elle désacétyle les deux protéines. Sirt1 est impliquée dans la réparation de l'ADN grâce à son action sur p53, laquelle régule le cycle cellulaire, la mort cellulaire et la réparation de l'ADN suite à différents stress. La protéine p53 est acétylée sur deux résidus lysine, K320 et K382, par p300. En revanche, sa désacétylation se fait grâce à

HDAC1 ou Sirt1, ce qui inhibe l'induction de l'apoptose et augmente la survie cellulaire. Afin de confirmer le rôle essentiel de Sirt1 et de ses orthologues, des mutants catalytiques de son orthologue SIR2 α ont été réalisés chez la souris [Mc Burney et al, 2003]. Au cours du développement, les embryons mutants homozygotes sont plus petits que les sauvages, environ la moitié meurt au cours du développement. Les mutants hétérozygotes ont des défauts dans la mise en place des yeux, des poumons et du pancréas. Une étude simultanée confirme ces résultats, de plus elle montre que les souris qui survivent à l'âge adulte, sont stériles, les femelles n'ovulent pas et les mâles ont des problèmes de spermatogenèse [Cheng et al, 2003]. Ces études confirment l'importance de Sirt1 au cours de l'embryogenèse. Etant donné le rôle de « senseur » métabolique joué par les sirtuines ainsi que leur capacité à moduler l'expression des gènes selon l'état de la cellule, de nombreuses études ont été réalisées concernant la capacité de réponse de Sirt1 suite à un stress métabolique tel que la restriction calorique (réduction modérée, de 20 à 40%, dans la prise de calories par rapport à une prise *ad libitum*, et qui ne compromet pas le maintien de tous les nutriments essentiels [Canto & Auwerx, 2009]). Les premières observations réalisées ont été faites chez la levure, où une diminution de la concentration de glucose (de 2% à 0,5%) dans le milieu de croissance augmente leur durée de vie de façon Sir2-dépendante et fait basculer la stratégie métabolique de la fermentation vers la respiration [Lin et al, 2002]. Ce changement métabolique régule l'activité de Sir2 par une augmentation du rapport NAD/NADH [Lin et al, 2004]. Lors d'une mutation de Sir2 dans les mêmes conditions de culture, il n'y a pas d'augmentation de la durée de vie observée. Le mécanisme mis en jeu touche le *silencing* de l'ADN ribosomal. Chez la levure, plus le nombre de cycles de sporulation est élevé, plus il y a apparition de cercles d'ADN ribosomal dû à des recombinaisons homologues. L'accumulation de ces cercles est signe de vieillesse. Lorsque Sir2 est surexprimée ou stimulée lors d'une restriction calorique, le taux de recombinaison diminue car Sir2 la réprime, ce qui augmente la durée de vie [Guarente, 2005]. Cette augmentation de la longévité, qui peut aller jusqu'à 50%, a été observée en plus de la levure, chez les rotifères, les araignées, les vers, les mouches, les poissons, les souris et les rats. Des études sont en cours chez le singe, mais les résultats préliminaires laissent penser que la complexité et le nombre des mécanismes touchés par une restriction calorique rend les résultats difficilement interprétables. En effet, les singes sous restriction calorique sont protégés de nombreux changements physiopathologiques associés à l'âge, comme le développement de résistance à l'insuline et de diabète de type 2, d'athérosclérose, de sénescence du système immunitaire,... [Canto & Auwerx, 2009]. Il existe donc un mécanisme conservé à travers les espèces et l'évolution qui relie l'augmentation de la durée de vie lors d'une restriction calorique et qui implique Sir2 ou ses orthologues. Sirt1 est impliquée dans nombreuses voies métaboliques et de résistances aux stress (**Figure 27**), en

agissant directement sur des facteurs de transcription, tels que p53 [Langley et al, 2002; Vaziri et al, 2001], FoxO (facteur de transcription de type *Forkhead Box*) [Brunet et al, 2004] ou encore NF- κ B [Yeung et al, 2004]. Chez *C. elegans*, des études génétiques montrent que l'augmentation de la durée de vie en réponse à une restriction calorique dépend de



l'orthologue de FoxO, DAF-16, un facteur de transcription clé dans la voie de signalisation IGF-like [Tissenbaum & Guarente, 2001], indiquant une fonction pour Sir2/Sirt1 dans la voie de signalisation insuline/IGF. Pour cela, Sir2.1 interagit avec la protéine 14-3-3 afin d'activer DAF-16. De plus FoxO est une cible de CBP et est désacétylé par Sirt1, ce qui permet son maintien au niveau des promoteurs des gènes cibles, lesquels codent pour diverses protéines, comme le récepteur à l'insuline ou à l'IGF [Van Der Heide et al, 2004], des facteurs impliqués dans la néoglucogenèse, tels que la glucose-6-phosphatase et la phosphoénolpyruvate carboxykinase [Greer & Brunet, 2005]. La voie de signalisation dépendante des récepteurs à l'insuline (IR, *Insulin Receptor*) et au facteur de croissance *Insulin-like* (IGF-1) est centrale aux mécanismes déterminant la longévité. Schématiquement, la stimulation de cette voie entraîne une diminution de la durée de vie tandis qu'une inhibition l'augmente, grâce aux deux facteurs clés, FoxO et Sir2/Sirtuine 1 (Sirt1) [Morris, 2005 ; Nemoto *et al.*, 2004]. De plus Sirt1 peut augmenter le relargage de l'insuline et modifier la sensibilité à l'insuline d'une cellule [Bordone et al, 2006 ; Moynihan et al, 2005 ; Sun et al, 2007].

Sirt2, orthologue de Hst2 de levure, est une protéine cytoplasmique, qui a pour substrat principal la tubuline (désacétylation de K40). Son expression augmente avant la mitose et est phosphorylée au moment de la transition en les phases G2 et M, ce qui laisse

supposer qu'elle jouerait un rôle dans la régulation du cycle cellulaire. On la retrouve fortement exprimée au niveau du cœur, du cerveau, des testicules et des muscles squelettiques [North & Verdin, 2004 ; Blander & Guarente, 2004].

Sirt3 est le plus proche paralogue de Sirt2, est exprimé dans les mêmes tissus avec en plus le rein et le foie [Blander & Guarente, 2004]. Elle possède une structure un peu différente (à l'exception de Sirt3 de souris, Sir2L3) des autres sirtuines car elle porte une extension d'une centaine d'acides aminés du côté amino-terminal, dont le clivage protéolytique par la MPP (*Mitochondrial-Matrix Processing Peptidase*) est essentiel pour être enzymatiquement active. Elle est localisée dans la matrice mitochondriale et donc son substrat préférentiel n'est pas les histones [North & Verdin, 2004]. Elle est importante pour la régulation des fonctions mitochondriales, sa surexpression augmente la respiration et diminue la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [Haigis & Guarente, 2009].

Sirt4 ne possède aucune activité histone désacétylase mais possède une activité ADP-ribosyltransférase importante [Ahuja et al, 2007]. Elle est également mitochondriale et joue un rôle important dans la sécrétion d'insuline, stimulée par des acides aminés au niveau des cellules β du pancréas, et inhibe la *glutamate dehydrogenase* (GDH). La GDH convertit le glutamate en α -kétoglutarate. Sirt4 permet également de faire le lien de la sécrétion d'insuline lors d'une restriction calorique [Haigis & Guarente, 2009].

Sirt5 est très distante de Sir2 dans l'arbre phylogénétique. Elle est présente dans la matrice mitochondriale de nombreux tissus. Une faible activité désacétylase a été montrée et aucune activité ribosyltransférase. Aucune donnée concernant son substrat physiologique ainsi que son rôle dans les cellules mammifères ne sont connues actuellement [Blander & Guarente, 2004 ; Haigis & Guarente, 2009].

Sirt6 est nucléaire, exprimée dans nombreux tissus. Il a été démontré qu'elle possède une faible activité désacétylase, *in vitro*, cependant son activité ADP-ribosyltransférase est plus importante [Liszt et al, 2005]. Les souris KO pour Sirt6 possède de nombreuses déficiences (densité osseuse diminuée, perte de la graisse sous-cutanée, défaut dans la réparation de l'ADN par excision de base, hypoglycémie,...), ce qui entraîne leur mort dans les quatre semaines après leur naissance [Haigis & Guarente, 2009].

Sirt7 est également nucléaire et son expression corrèle avec la croissance cellulaire puisqu'elle est abondante dans les tissus fortement prolifératifs (foie, rate et testicules) et absente ou faiblement exprimé dans les tissus non prolifératifs (cœur, cerveau et muscles) [Ford et al, 2006]. Elle régule également le métabolisme et est associée avec l'ADN ribosomal et l'ARN Polymérase I. Sa surexpression augmente la transcription de l'ARN ribosomal et sa sous-expression réprime la transcription [Haigis & Guarente, 2009].

L'activité désacétylase des sirtuines peut être activée ou réprimée par diverses molécules. Le domaine catalytique, où ont lieu le clivage du NAD⁺ pour la désacétylation et l'inhibition du nicotinamide, joue un rôle important dans la régulation des sirtuines par divers régulateurs physiologiques, mais également pour le développement de régulateurs synthétiques. Le nicotinamide est un produit de dégradation et également un inhibiteur non-compétitif de cette famille de protéines. Des levures cultivées en présence de nicotinamide présentent une réduction importante de « *gene silencing* », une augmentation dans le taux de recombinaison de l'ADNr et une espérance de vie diminuée. Chez l'Homme, lors de cancers, les inhibiteurs de sirtuines empêchent la désacétylation de p53 et induisent l'apoptose. Le sirtinol est le premier inhibiteur identifié grâce à un criblage de banque de mille six cents molécules, c'est un dérivé du 2-hydroxy-1-naphthaldéhyde. Il est efficace puisque la valeur d'IC50 est de 68µM et 38µM contre Sir2 de levure et Sirt2 humaine [Grozinger et al, 2001]. De nombreuses autres molécules (splitomycine, cambinol, surfactine,...) ont été identifiées grâce aux criblages comme potentiels inhibiteurs de sirtuines, elles sont plus ou moins efficaces et spécifiques selon les sirtuines, mais elles sont le point de départ pour une optimisation des molécules obtenues afin de mettre en place d'éventuelles applications thérapeutiques [Sanders et al, 2009].

L'activateur de sirtuines le plus répandu est le resvératrol. C'est un produit présent naturellement dans le vin rouge, qui active Sirt1. C'est un activateur allostérique, qui permet d'augmenter l'affinité de Sirt1 pour le NAD⁺ et le substrat acétylé, grâce à un changement conformationnel [Jiang, 2008 ; Grubisha et al, 2005]. Il a été démontré qu'il permet alors une augmentation de la durée de vie chez de nombreux organismes modèles. Cependant il n'y a pas d'augmentation de la durée de vie chez des levures cultivées sous restriction calorique, ce qui suppose que la même voie est cible de ces deux « conditions » [Blander & Guarente, 2004].

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Actuellement, plusieurs études ont été réalisées et ont été consacrées à l'épigénétique du schistosome, et plus particulièrement les enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles. A noter que chez ce parasite, aucune enzyme capable de méthyliser l'ADN n'a été identifiée, cette modification a pourtant récemment été mise en évidence. Nous allons nous focaliser sur l'autre modification la plus répandue qui touche les histones, la balance acétylation/ désacétylation.

La première partie de ma thèse porte sur les HDACs de classe I. Dans un premier temps, nous avons identifié et caractérisé plusieurs membres de cette famille de protéines. Puis dans un second temps nous nous sommes intéressés aux effets d'inhibiteurs de HDACs sur les enzymes caractérisées ainsi que sur le parasite et sur sa survie.

La deuxième partie de ma thèse se focalise sur une HDAC de classe III, Sirt1. Suite à sa mise en évidence et sa caractérisation, nous portons notre intérêt sur son implication dans la longévité, notamment sur son interaction avec FoxO, partenaire que nous avons également identifié. En effet, nous savons que chez les organismes modèles, une restriction calorique va de pair avec une augmentation de la durée de vie et une baisse de la fécondité. Or, chez *S.mansoni*, il existe un paradoxe puisque le ver adulte est situé au niveau des veines mésentériques chez l'Homme, où il ne subit aucune restriction calorique, car le milieu est très riche en glucose. Cependant, les vers adultes peuvent vivre très longtemps au sein de leur hôte définitif en ayant une fécondité toujours importante, puisque la femelle pond environ trois cents œufs par jour. Nous tentons de mettre en évidence, si chez *S. mansoni*, Sirt1 et FoxO possèdent les fonctions conservées comme chez les organismes modèles. Mais également si la voie de signalisation dépendante du récepteur à l'insuline aboutit à Sirt1 et FoxO, comme chez les autres organismes ou est-ce que cela permettrait d'expliquer le « paradoxe du schistosome » décrit précédemment.

LES ENZYMES SmHDACs : CARACTERISATION DE TROIS SmHDACs DE CLASSE I CHEZ *SCHISTOSOMA MANSONI* ET LEURS IMPLICATIONS DANS LA SURVIE PARASITAIRE

Présentation

La régulation de l'expression de gènes est un mécanisme complexe au cours duquel de nombreux acteurs interviennent. Malgré la conservation importante de la plupart des facteurs de transcription, la variation à ce niveau serait l'un des moteurs principaux de l'évolution des espèces. Notamment, il a été démontré que les modifications épigénétiques et les enzymes responsables sont fortement impliquées dans ces changements [Strahl & Allis, 2000].

Chez le schistosome peu de choses sont connues quant aux mécanismes épigénétiques existants, cependant plusieurs études se sont focalisées sur l'acétylation des histones *via* les HATs. Grâce à deux équipes, deux orthologues de CPB/p300 ont été mis en évidence, SmCBP1 et SmCBP2 [Bertin et al, 2006], mais également un orthologue de GCN5, SmGCN5 [de Moraes Maciel et al, 2004]. Suite aux travaux antérieurs de l'équipe du Dr Pierce, il est apparu essentiel et logique de poursuivre ces travaux et donc de s'intéresser à la réaction inverse, la désacétylation. Ce choix a été également déterminé par le fait que, malgré leur conservation au cours de l'évolution, les histones désacétylases (HDACs) font l'objet d'études comme cibles thérapeutiques potentielles contre les cancers [Bolden et al, 2006] et contre certaines parasitoses [Ouaissi & Ouaissi, 2006]. Plusieurs inhibiteurs ont un avenir prometteur pour le traitement de ces maladies.

La première partie du travail sur les HDACs a tout d'abord consisté en leur mise en évidence et leur caractérisation chez *S. mansoni*. Le criblage des banques de données nous a permis d'identifier trois orthologues potentiels de HDACs chez le parasite. Suite à leur clonage et caractérisation, nous avons identifié les orthologues des HDACs de mammifères de classe I HDAC1, 3 et 8 ; HDAC2 étant absente chez les invertébrés. La mise en évidence de HDAC8 chez *S. mansoni* a permis de montrer que cette protéine n'est pas spécifique des vertébrés. De plus les insertions dans son domaine catalytique laissent présager des propriétés enzymatiques spécifiques. Les transcrits des trois gènes sont retrouvés à tous les stades du cycle parasitaire, ce qui se justifie par les rôles essentiels de ces protéines pour les mécanismes de régulation de la transcription. Puis l'intérêt porté à SmHDAC1 a permis de montrer la conservation de sa capacité de répression de la transcription, grâce à des transfections transitoires en système hétérologue.

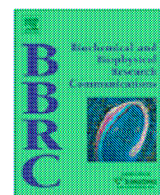
Dans la deuxième partie des travaux sur les HDACs, nous avons voulu en connaître davantage sur la conservation ou au contraire la divergence de mécanismes régulant la transcription chez *S. mansoni*. Pour cela nous avons porté nos investigations sur l'importance de l'acétylation au cours des deux stades parasitaires touchant l'Homme, le schistosomule et le ver adulte, grâce à l'utilisation de trois inhibiteurs spécifiques des HDACs, la trichostatine A (TSA), l'acide valproïque (VPA) et l'acide hydroxamique subéroylanilide (SAHA). Ces trois drogues inhibent la désacétylation globale des HDACs à tous les stades du cycle. De plus la TSA et le VPA induisent la mort des parasites en culture de manière dose-dépendante, la TSA ayant un effet plus rapide. Nous avons montré par ailleurs, qu'en présence de TSA, cette mort est due à la mise en place de l'apoptose chez le schistosomule. Afin d'observer les conséquences moléculaires des drogues chez le parasite, nous avons évalué le taux d'acétylation des protéines et notamment des histones H3 et H4 au cours de deux stades. Nous montrons alors que la TSA et le VPA augmentent le taux d'acétylation notamment de l'histone H4 qui est plus fortement acétylée que l'histone H3, où aucun impact significatif n'a été mesuré. De plus le traitement par la TSA lors de l'hyperacétylation des histones est à corrélérer avec l'expression des transcrits de certains gènes cibles des HDACs, comme *Caspase 3* et *Caspase 7*, impliqués dans l'apoptose. Finalement nous mettons en évidence une hyperacétylation de l'histone H4 au niveau des régions promotrices du gène cible *Caspase 7* suite au traitement par la TSA.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

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



The class I histone deacetylases of the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*

Frédéric Oger^{a,1}, Florence Dubois^a, Stéphanie Caby^a, Christophe Noël^b, Jocelyne Cornette^a, Benjamin Bertin^a, Monique Capron^a, Raymond J. Pierce^{a,*}

^aInserm, U 547, Lille, France; Université Lille 2, Lille, France; Institut Pasteur de Lille, IFR 142, 1 rue du Professeur A. Calmette, 59019 – Lille, France

^bSchool of Biology, Institute for Research on Environment and Sustainability, Devonshire Building, University of Newcastle upon Tyne, NE1 7RU, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 October 2008

Available online 31 October 2008

Keywords:

Histone deacetylase
Schistosoma mansoni
Parasite
Transcription

ABSTRACT

Histone deacetylases (HDAC) form a conserved enzyme family that control gene expression via the removal of acetyl residues from histones and other proteins and are under increasing investigation as therapeutic targets, notably in cancer and parasitic diseases. To investigate the conservation of these enzymes in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*, we cloned and characterized three class I HDACs, orthologues of mammalian HDAC1, 3 and 8, and confirmed their identities by phylogenetic analysis. The identification of an HDAC8 orthologue showed that it is not vertebrate-specific as previously thought and insertions in its catalytic domain suggest specific enzymatic properties. SmHDAC1, 3, and 8 mRNAs are expressed at all schistosome life-cycle stages. SmHDAC1 repressed transcriptional activity in a mammalian cell line and this activity was dependent on its catalytic activity since transcription was partially restored by treatment with trichostatin A and a catalytic site mutant failed to repress transcription.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Among the epigenetic mechanisms that contribute to the control of gene expression, the post-translational modification of the amino-terminal domains of histones by acetylation/deacetylation directly affects chromatin structure and is a key component of the histone code [1]. The enzymes involved, histone acetyltransferases (HAT) and histone deacetylases (HDAC), have been extensively studied in model organisms, and the latter are actively targeted for drug development in various pathologies, particularly cancer [2] and parasitic diseases [3].

Schistosomes are platyhelminth parasites that infect 200 million people and cause about 200,000 deaths annually [4]. Schistosomiasis therefore remains a major health problem, particularly in sub-Saharan Africa and although the only available drug, Praziquantel, is effective and safe, concerns about the development of resistance, particularly by *Schistosoma mansoni* [5], mean that new treatments are needed to treat and control this disease. Enzymes involved in histone modification in *S. mansoni* are potential novel drug targets. We and others have previously described the molecular and functional characterization of two types of histone acetyltransferase (HAT), SmCBP/p300 [6] and SmGCN5 [7] but nothing is currently known about the reverse reaction catalysed by histone deacetylase enzymes (HDAC) in the parasite.

HDACs are zinc metallo-enzymes that catalyse the deacetylation of lysine in various proteins. In the case of histone amino-terminal tails the resulting compaction of the chromatin structure reduces the accessibility of promoters for transcription factors and inhibits transcription. HDACs have been divided into three main classes on the basis of their protein sequence homologies with yeast deacetylase enzymes [8]. Briefly, class I HDACs, composed of HDAC 1, 2, 3 and 8, are closely related to yeast Rpd3 (reduced potassium dependency 3) transcriptional regulator. Class II HDACs, including HDAC 4, 5, 6, 7, 9 and 10, share domains with similarity to yeast Hda1 (histone deacetylase I). All these HDACs have a conserved catalytic domain. HDACs are therefore ancestral enzymes that play a crucial role in the regulation of gene expression in eukaryotes.

In order to understand the epigenetic control of transcription associated with the acetylation/deacetylation balance in *S. mansoni* and to determine whether *S. mansoni* HDACs (SmHDAC) are potential therapeutic targets against schistosomiasis, we initiated the first study of these enzymes in this parasite. We have identified and characterised the three class I enzymes, SmHDAC1, 3 and 8 the catalytic domains of which are phylogenetically well conserved, although that of SmHDAC8 contains insertions. Moreover, SmHDAC8 is the first HDAC8 enzyme characterized in an invertebrate organism. We also show that SmHDAC1 can repress transcription, indicating that the catalytic mechanism, involving interactions with other co-repressor proteins, is conserved in *S. mansoni*.

* Corresponding author. Fax: +33 320877888.

E-mail address: Raymond.Pierce@pasteur-lille.fr (R.J. Pierce).

¹ Present address: UMR CNRS 6026, SPARTE, Université de Rennes I, IFR 140 GFAS, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex, France.

Materials and methods

Parasites. A Puerto-Rican strain of *S. mansoni* was maintained in *Biomphalaria glabrata* snails and golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). Cercariae were released from infected snails, harvested as described previously [6] and schistosomula were obtained *in vitro* [9]. Adult worms were obtained by whole-body perfusion of 6-week infected hamsters [10]. Eggs were obtained from the livers of infected hamsters and hatched out under light to obtain miracidia [11]. Primary sporocysts were obtained after overnight axenic culture of miracidia as described [11]. Parasite nucleic acids were extracted from the free-living cercariae using standard methods [12].

Molecular cloning of *S. mansoni* HDACs. *Schistosoma mansoni* EST sequences encoding peptides with significant identity to class I HDACs were detected by tblastn screening of the EST database (http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gireport.pl?gudb=s_mansoni) using the human HDAC1 peptide sequence (NP_004955) as a probe. These sequences were used to screen the genomic sequence assembly 3 at the Wellcome Trust Sanger Institute (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_mansoni). Sequence alignments and analysis were carried out using the DNASTar LaserGene programme package. Complete cDNA sequences of *S. mansoni* HDACs were obtained by 5' and 3' RACE amplification (SMART RACE cDNA Amplification kit, Clontech) according to the manufacturer's instructions. All oligonucleotide primers used in this study are listed in Table 1 in supplementary material online. Fragments encompassing the complete coding sequence of each HDAC were obtained by PCR on adult worm cDNA, cloned and sequenced as previously described [6].

Phylogenetic analysis. Accession numbers of the sequences included in the data set are listed in the legend to Fig. 2. Amino acid sequences were aligned with the use of the BioEdit v7.0.1 package (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) and phylogenetic inference was restricted to sites that could be unambiguously aligned (338 shared sites, corresponding to the catalytic domain, were analysed). Phylogenetic analysis of the data set was carried out using two different methods. Bayesian analysis (MrBAYES v3.1.2 [13]) was performed as previously described [14]. A second analysis of the same data was carried out using PhyML [15] using the same model. Bootstrap analysis was done on 500 repetitions.

Quantitative RT-PCR. Real-time quantitative PCR was carried out exactly as previously described [16]. Primers (Table 1 in supplementary material online) were designed by the Primer Express Program (Applied Biosystems) and used for amplification in triplicate assays. Determination of PCR efficiency and calculations of the relative expression were also as previously [16] according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [17].

Plasmid constructions, cell culture and transfection. The pTL1-Gal4 vector and pFLuc reporter plasmid were as previously described [18]. The vector pCMV-BD-NF- κ B expressing the Gal4-NF- κ B fusion protein was a kind gift from Pr. G. Salbert (CNRS, University of Rennes, France). In the case of the SmHDAC1-V5 construct, the coding sequence was cloned into the Bam HI-Not I restriction sites of the pcDNA3.1/V5-His C vector (Invitrogen) in frame with the C-terminal V5 tag. Co-transfection assays using HEK-293T cells were performed as previously described [16]. Each experiment represents at least three sets of independent triplicates and statistical significance was determined using the Mann-Whitney test. The expression of SmHDAC1-V5 or Gal4 proteins in transfected cells was verified by Western blotting as previously described [19]. Anti-sera used were Gal4 DBD mouse monoclonal IgG2a (Santa Cruz Biotechnology) and anti-V5 antibody (Invitrogen).

Site-directed mutagenesis. The SmHDAC1 catalytic mutant was generated by modifying two His residues (H176/177A) involved

in coordinating the active site Zn²⁺ ion using the QuikChange® Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene™), according to the manufacturer's instructions using oligonucleotides HD1H176-177A3 and HD1H176-177A5 (Table 1 in supplementary materials online). Following sequence verification, positive clones were used directly in transfection assays.

Results and discussion

Molecular cloning and characterization of *S. mansoni* class I HDACs

The class I HDACs of *S. mansoni* were identified by screening the available EST and genomic databases with the peptide sequence of human HDAC1 using tblastn. This screen identified 8 ESTs or contigs of interest, listed in Table 2 in supplementary material online, of which 2 potentially corresponded to HDAC1, 4 to HDAC3 and 2 to HDAC8. Screening of the genomic assembly suggested that only one copy of each HDAC gene was present. No other class I HDACs were detected in these or subsequent screens. Complete cDNA sequences were compiled using 5' and 3' RACE and the coding sequences were amplified from cDNA. These sequences were submitted to GenBank with the Accession Nos. EF077626, EF077627 and EF077628. In common with *Drosophila melanogaster*, *S. mansoni* has only one representative of the HDAC1/2 subfamily. Both HDAC1 and HDAC2 are present in vertebrates, and *Caenorhabditis elegans* also shows an independent duplication of its HDAC1 [20]. The absence of such duplication in the *S. mansoni* genome is surprising in view of the propensity of this parasite for gene duplication that includes transcription factors (such as the Ftz-F1 nuclear receptors [21,22]) and cofactors (such as CBP/p300 [6]).

The alignment of the catalytic domains of the *S. mansoni* class I HDACs with those of HDACs from the mouse and *D. melanogaster* (*Tribolium castaneum* in the case of HDAC8) shows that the essential residues for HDAC catalytic activity are conserved in all three *S. mansoni* HDACs, including the residues binding the Zn²⁺ ion (Fig. 1). Moreover, the residues making contact with the inhibitor trichostatin A (TSA) in *Aquifex aeolicus* HDLP [23] are also conserved, indicating that *S. mansoni* HDACs could be inhibited by TSA in common with all other class I HDACs.

Although SmHDAC8 displays the general level of conservation of its catalytic domain indicated above, its alignment with other HDACs (Fig. 1) shows that it contains six insertions of between 4 and 17 aa not present in any other HDAC8 family member. The catalytic domain of human HDAC8 comprises 11 α -helices and 8 β -strands around seven loops forming the catalytic pocket [24]. The positions of the insertions compared to these structural motifs (Fig. 1) shows that the two largest (10 and 17 aa) are present within loops 4 and 6 of the catalytic pocket. HDAC8 has a larger and deeper pocket than HDLP and this is thought to indicate differences in substrate specificities in the HDAC8 subfamily [24]. The additional structural changes in SmHDAC8 possibly point to further differences in specificity that could be exploited for the development of schistosome-specific inhibitors. However, modelling of the catalytic domain to that of human HDAC8 (Fig. 1 in supplementary material online) shows that the residues involved in the active site are highly conserved and that the insertions within the catalytic domain sequence form structures on the surface of SmHDAC8 and do not affect the catalytic pocket itself. These structures could be involved in specific interactions with other protein partners.

Molecular phylogeny of *S. mansoni* HDACs

In order to define the identity of the three *S. mansoni* class I HDACs, phylogenetic analysis of the conserved catalytic domain was carried out using two methodologies (PHYML and MrBAYES)

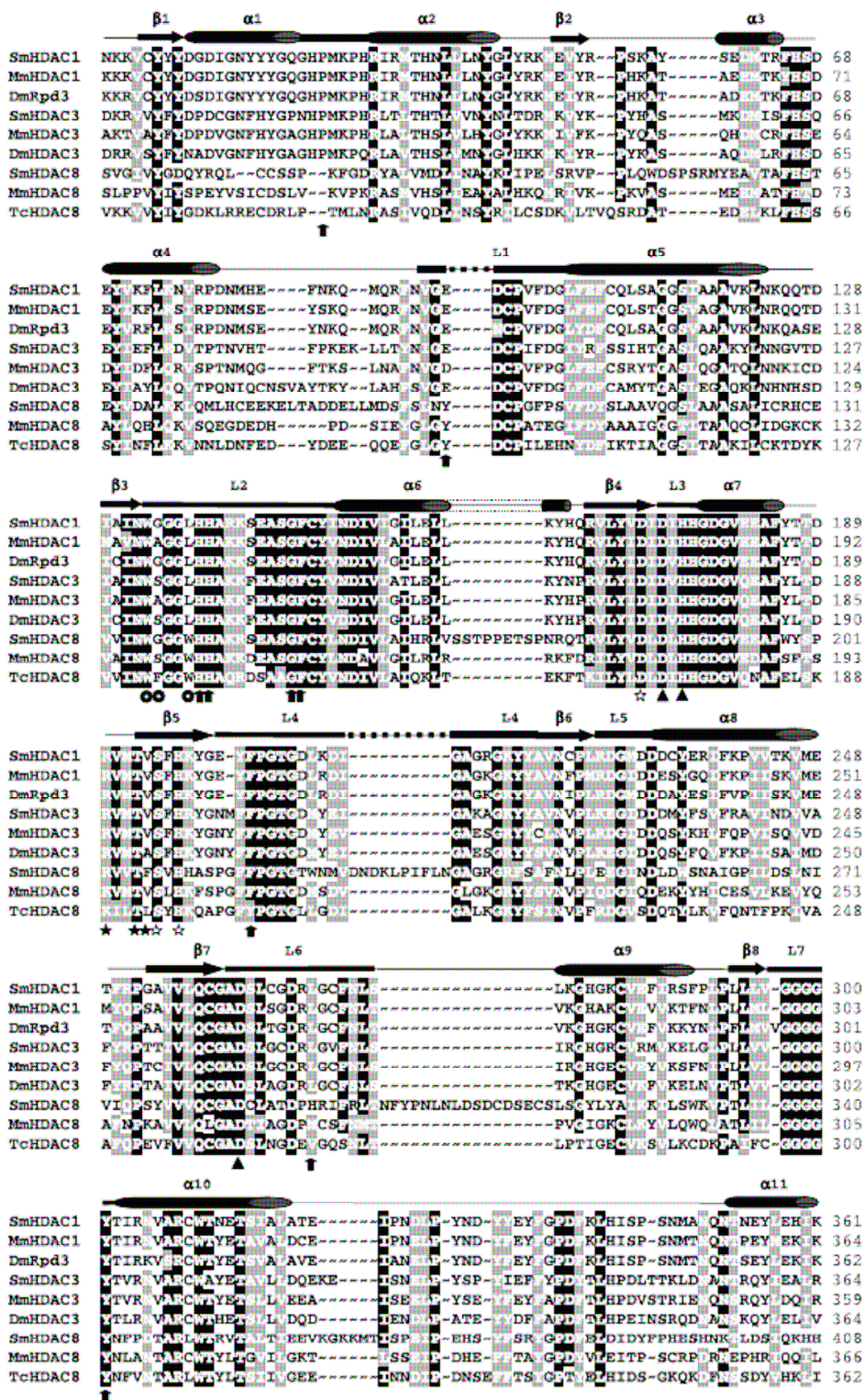


Fig. 1. Alignment of SmHDAC catalytic domains with mammalian and insect orthologues. The catalytic domains were aligned according to [24]. Sequences used in the alignment in addition to SmHDAC1, 3 and 8 are *Mus musculus* HDAC1 (MmHDAC1; Accession No.: NP_997108) HDAC3 (MmHDAC3; NP_034541) and HDAC8 (MmHDAC8; NP_081658), *Drosophila melanogaster* Rpd3 (DmRpd3; NP_647918) and HDAC3 (DmHDAC3; AAC83649) and *Tribolium castaneum* HDAC8 (TcHDAC8; XP_971085). Secondary structures are represented according to [24] above the alignment as cylinders (α -helices), arrows (β -pleated sheets) and thick lines (loops). Conserved residues indicated below the alignment are involved in coordinating the zinc ion (triangles) coordinating potassium ions (open stars, site 1; filled stars, site 2) residues lining the internal cavity (circles) and residues contacting TSA (arrows).

with similar results. The phylogenetic tree (Fig. 2), generated using MrBAYES with the class II mouse HDAC4 as the outgroup, supports all the main branch points by high BPP values and groups the class

I HDACs into two main families. The first comprises HDACs 1 and 3 from vertebrates, insects, other invertebrates including *S. mansoni*, as well as protozoa and plants, although the latter are on separate



Fig. 2. Phylogenetic analysis of *S. mansoni* class I HDACs. Analysis of class I HDAC catalytic domains was carried out by Bayesian inference restricted to sites that could be unambiguously aligned (338 shared sites). Numbers at branch points are Bayesian Posterior Probabilities (BPP). Sequences used were as in Fig. 1, with the addition of *Danio rerio* HDAC1 (DrHDAC1; AAH85375), HDAC3 (DrHDAC3; AAH44543) and HDAC8 (DrHDAC8; NP_998596), *Strongylocentrotus purpuratus* HDAC1 (SpHDAC1; NP_999711) and HDAC8 (SpHDAC8; XP_79115), *Anopheles gambiae* HDAC1 (AgHDAC1; EAA11382) and HDAC3 (AgHDAC3; EAA01056), *Caenorhabditis elegans* Rpd3 (CeRpd3; NML_078299) and HDAC2 (CeHDAC2; NP_495678), *Dictyostelium discoideum* HDAC1 (DdHDAC1; XP_647498) and HDAC3 (DdHDAC3; XP_646719), *Arabidopsis thaliana* HD1 (AtHD1; NP_195526), *Zea mays* HD101 (ZmHD101; AAK67142), *Toxoplasma gondii* HDAC3 (TgHDAC3; AAY53803), *Theileria parva* HDAC (TpHDAC; XP_764608), *Schizosaccharomyces pombe* HDAC1 (SpoHDAC1; CAA15916), *Saccharomyces cerevisiae* Rtl1 (ScRTL1; CAA96906), *Homo sapiens* HDAC8 (HsHDAC8; CAB90213), *Aedes aegypti* HDAC8 (AeHDAC8; EAT44179) and *Mus musculus* HDAC4 as the outgroup (MmHDAC4; NP_997108).

branches from the main HDAC1 and 3 subfamilies. SmHDAC1 and 3 are positioned similarly in their respective branches and their positions in the tree clearly support their identity as orthologues of HDACs 1 and 3.

The second grouping comprises the HDAC8 subfamily, including SmHDAC8. The discovery of a schistosome orthologue of HDAC8 was surprising since it has been suggested [20] that HDAC8 is restricted to vertebrates. These authors did allow that the deep divergence of the HDAC8 branch they observed may indicate that it is an ancient protein lost from the invertebrate organisms they analysed. However, their preferred explanation was that the branch was mispositioned due to the rapid divergence of the HDAC8 subfamily. The unequivocal positioning of SmHDAC8 within the HDAC8 branch on our tree (Fig. 2) refutes this hypothesis. Moreover, the presence of HDAC8 family genes in the genomes of *T. castaneum* and *Aedes aegypti* as well as in the echinoderm

Strongylocentrotus purpuratus, identified for the first time in our analysis, shows that HDAC8 diverged from the other class I HDACs before the deuterostome/protostome split.

Schistosoma mansoni class I HDACs are expressed at all life-cycle stages

Quantitative real-time RT-PCR was carried out to determine the levels of expression of each of the *S. mansoni* class I HDAC mRNAs during the parasite life-cycle (Fig. 3). All three HDACs showed similar profiles of expression (Fig. 3A) with the highest levels being present in miracidia (free-living larvae that infect the snail intermediate host) and relatively low levels in schistosomula (larvae present in the vertebrate host) in the case of SmHDAC3 and 8. Elevated quantities of mRNAs encoding a variety of *S. mansoni* proteins have been found in miracidia including the transcriptional co-activators SmCBP1, SmCBP2 and SmGCN5 [6,7], the co-repressor SmFIP-1 and the nuclear receptor SmFtz-F1 [16], possibly due to stocking of mRNA that is translated upon invasion of the snail host.

Although expression levels calculated relative to those of adult male worms show a similar pattern for each class I SmHDAC, this is not true when levels of expression of each SmHDAC at a given life-cycle stage are compared (Fig. 3B). This shows that, apart from the schistosomulum larval stage, SmHDAC8 is the most abundant class I transcript. SmHDAC3 is substantially less expressed than SmHDAC1 at all life-cycle stages and than SmHDAC8 (3–6-fold) at all stages except schistosomula. In human tissues HDAC3 is much more highly expressed than HDAC8, which shows the lowest expression of the four class I HDACs [25], and this is also true of cancer cell lines. The surprisingly high level of expression of SmHDAC8 further suggests that it has evolved specific and vital functions in the parasite.

SmHDAC1 represses transcription in transient co-transfection assays

In order to test whether *S. mansoni* HDACs were capable of repressing transcription in a similar manner to their mammalian

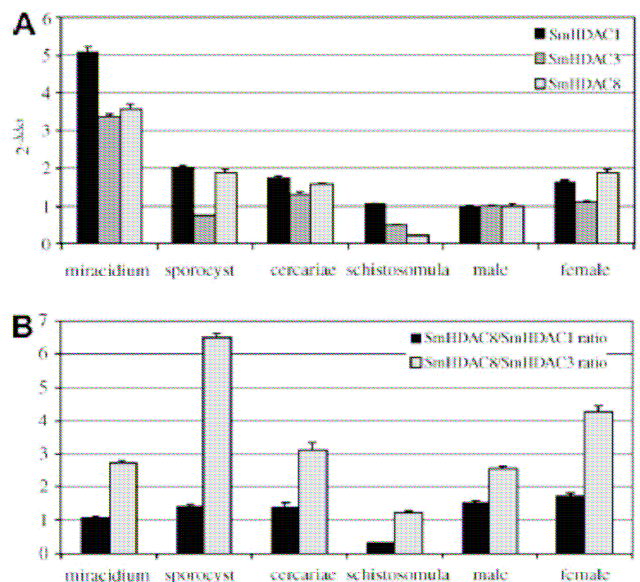


Fig. 3. Quantification of transcripts of SmHDAC1, 3 and 8 at different *S. mansoni* life-cycle stages. (A) SmHDAC1, 3 and 8 mRNA was measured in male and female adult worms, miracidia, sporocysts, cercariae and schistosomula by quantitative real-time PCR. *S. mansoni* α -tubulin was used as a reference gene [16]. Results are expressed as the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ratio compared to the expression in male worms taken arbitrarily as the base line. (B) Relative expression of SmHDAC8 compared respectively to SmHDAC1 (black bars) and SmHDAC3 (grey bars).

orthologues, we carried out co-transfection assays in mammalian cell lines using vectors expressing either the transcription factor Gal4 alone or as a fusion protein with NF- κ B, a reporter vector (pFRLuc) and another vector expressing SmHDAC1 on its own. In these assays SmHDAC1 consistently repressed Gal4 or Gal4-NF- κ B dependent luciferase expression in a dose-dependent manner. Fig. 4A shows results of a typical experiment carried out using the Gal4-dependent expression system in HEK-293T cells and the accompanying western blot (Fig. 4B) shows the dose-dependent

expression of SmHDAC1 in these cells, as well as the constant level of expression of the Gal4 fusion protein.

Using the vector expressing Gal4-NF- κ B we next demonstrated the dependence of this repressive activity on the histone deacetylase activity of SmHDAC1. First, the addition of 1 μ M TSA to cells expressing the Gal4-NF- κ B fusion protein in the absence of SmHDAC1 showed an approximate 4.5-fold increase in reporter gene expression, showing that the latter is partially repressed by endogenous factors (Fig. 4C). Addition of TSA to cells expressing both Gal4-NF- κ B and SmHDAC1, increased transcriptional activity about 2-fold over the baseline obtained in the absence of TSA or SmHDAC1, whatever the amount of the latter used in the co-transfection. The observed repression by SmHDAC1 was therefore clearly due to histone deacetylase activity, but the possible recruitment of endogenous class I HDACs by SmHDAC1 and the contribution of the former to the overall transcriptional repression obtained, could not be ruled out.

We next produced a catalytic mutant form of SmHDAC1 by modifying two His residues (H176/177A) in the active site that are involved in coordinating the Zn²⁺ ion. A similar mutation was shown to abolish completely the histone deacetylase activity of mouse HDAC1 [26]. This mutant (SmHDAC1mut) failed to repress Gal4-NF- κ B dependent transcriptional activity in co-transfection experiments (Fig. 4C) and increasing doses of this protein led to an increase in expression compared to cells transfected with the Gal4-NF- κ B expression plasmid alone. This may indicate that SmHDAC1mut can act as a dominant negative element by recruiting endogenous repression complexes and preventing their action on Gal4-NF- κ B dependent transcription.

Taken together, our results show that SmHDAC1 can act as a transcriptional repressor and that this activity is dependent on its histone deacetylase activity. Overall, we have shown that *S. mansoni* possesses conserved class I HDACs that, in common with other schistosome transcription factors and cofactors [6,16,18], probably have both conserved and schistosome-specific functions. Moreover, we have demonstrated that HDAC8 is not a vertebrate-specific enzyme and that the structural divergence of SmHDAC8 and the abundance of its transcript, make it a promising target for drug development.

Acknowledgments

The work was supported by Inserm (U547), the Institut Pasteur de Lille, the CNRS and the ANR (Grant No. ANR-07-BLAN-0119-02 2008-10). F.O. was supported by Inserm-Region Nord-Pas de Calais. F.D. is supported by the MENRT. We thank Pr. Gilles Salbert for the gift of the Gal4-NF- κ B vector.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbrc.2008.10.090.

References

- [1] T. Jenuwein, C.D. Allis, Translating the histone code, *Science* 293 (2001) 1074–1080.
- [2] J.E. Bolden, M.J. Peart, R.W. Johnstone, Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 769–784.
- [3] M. Ouaisi, A. Ouaisi, Histone deacetylase enzymes as potential drug targets in cancer and parasitic diseases, *J. Biomed. Biotechnol.* 2006 (2006) 13474.
- [4] B. Gryseels, K. Polman, J. Clerinx, L. Kestens, Human schistosomiasis, *Lancet* 368 (2006) 1106–1118.
- [5] M.J. Doenhoff, J.R. Kusel, G.C. Coles, D. Cioli, Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem?, *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96 (2002) 465–469.
- [6] B. Bertin, F. Oger, J. Cornette, S. Caby, C. Noel, M. Capron, M.R. Fantappie, F.D. Rumjanek, R.J. Pierce, *Schistosoma mansoni* CBP/p300 has a conserved domain

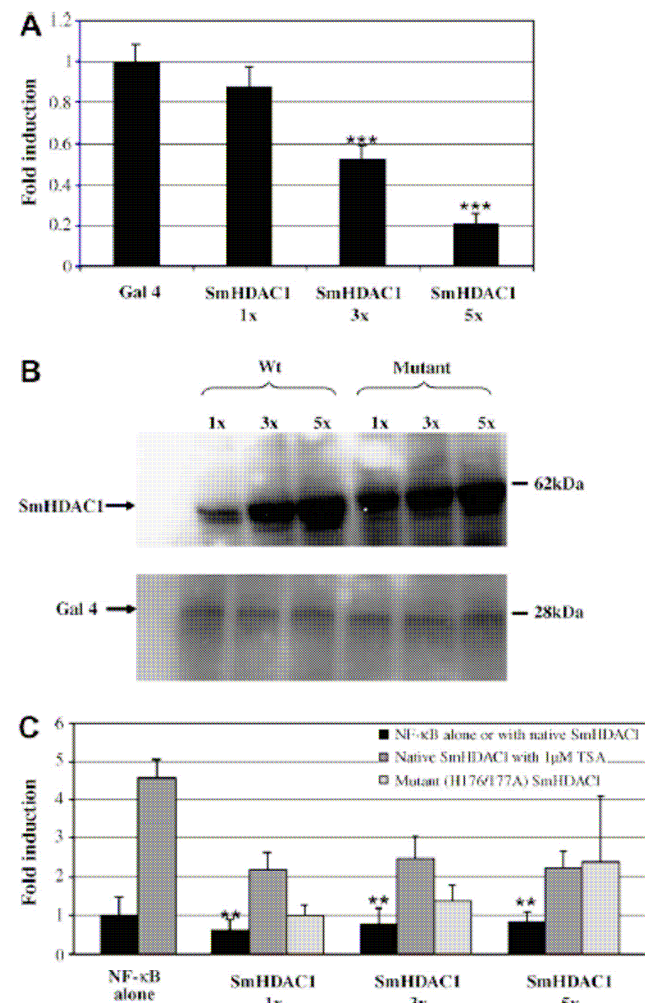
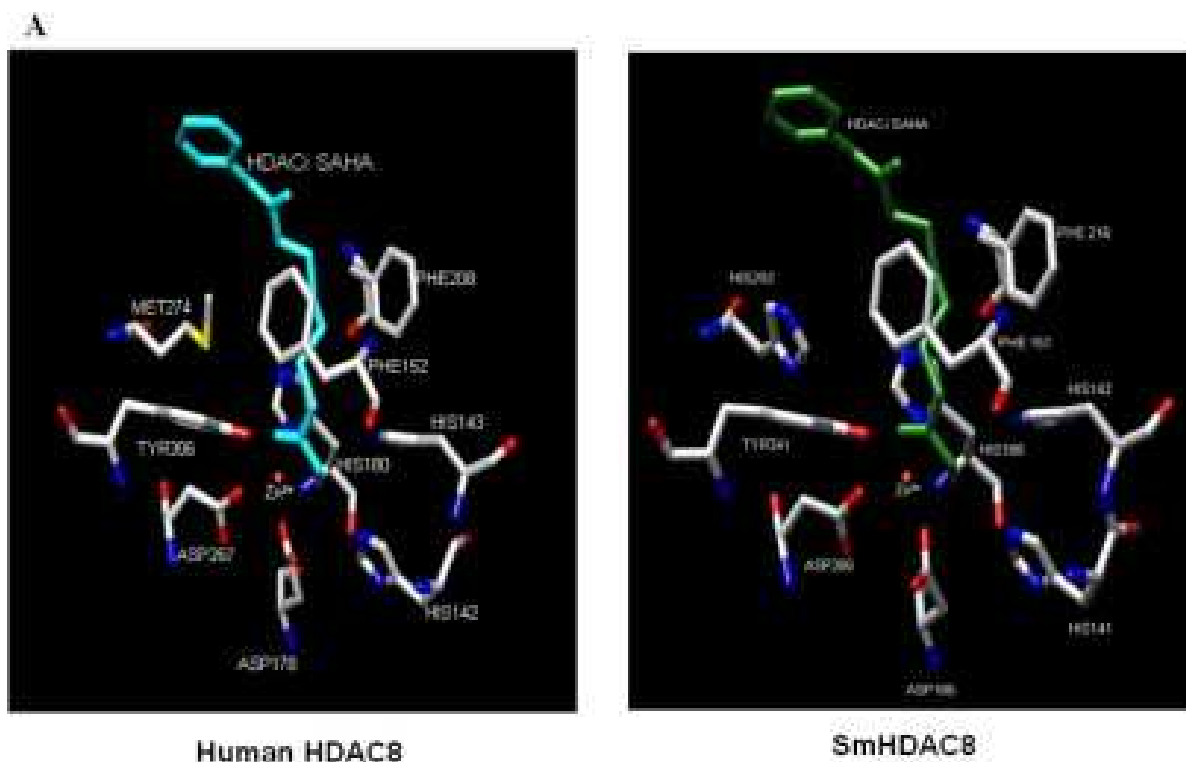


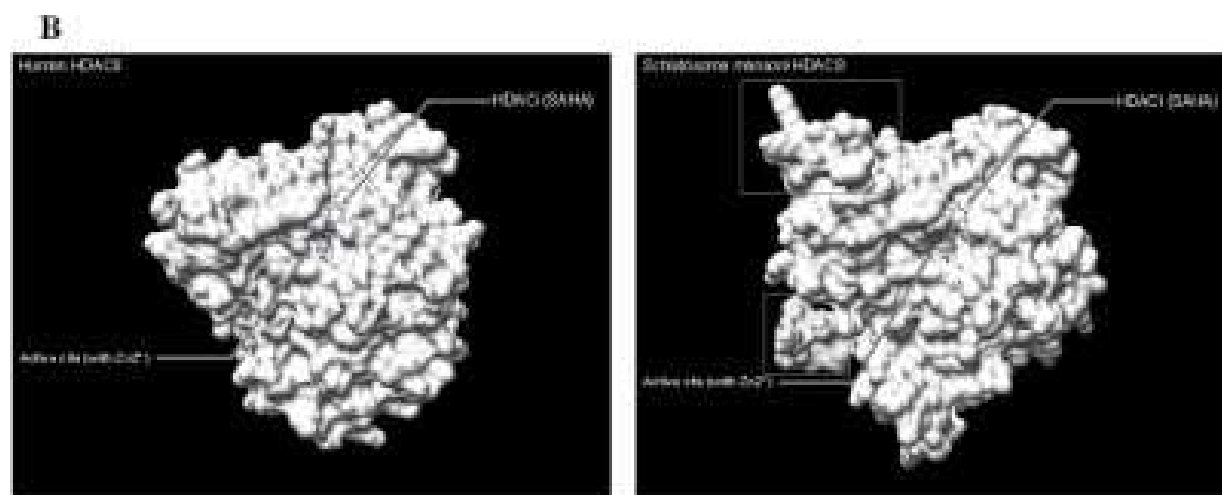
Fig. 4. Repression of transcription by SmHDAC1 is dependent on its histone deacetylase activity. (A) Repression of Gal4-dependent transcription by SmHDAC1 is dose-dependent. Increasing amounts of pcDNA3.1-SmHDAC1/V5 vector were co-transfected with the pTL1-Gal4 vector and the pFRLuc reporter vector (see Methods). Results are expressed as fold difference compared to the luciferase expression obtained in the presence of empty pcDNA 3.1/V5-His C vector. Results shown are from a representative experiment carried out in triplicate. The repression obtained with 3x and 5x amounts of the SmHDAC1/V5 expressing vector was significant ($p < 0.01$). (B) Western blot of the dose-dependent expression of native or mutant SmHDAC1 in transfected cells (upper panel) compared to the expression of the Gal4 protein (lower panel). Separate western blots were carried out using the same extracts of co-transfected cells. (C) Role of HDAC activity in SmHDAC1 mediated repression. Transcriptional activation was tested using the vector expressing the NF- κ B-Gal4 fusion protein alone (black bar), in the presence of native (black bars) or mutant (H176/177A; light grey bars) SmHDAC1/V5 at different doses or of native SmHDAC1/V5 with 1 μ M TSA (dark grey bars). Results are the means of five independent experiments carried out in triplicate. Transcriptional repression was significant ($p < 0.05$) at all doses of the SmHDAC1/V5 expressing vector.

- structure and interacts functionally with the nuclear receptor SmFtz-F1, *Mol. Biochem. Parasitol.* 146 (2006) 180–191.
- [7] R. de Moraes Maciel, D.L. de Silva Dutra, F.D. Rumjanek, L. Juliano, M.A. Juliano, M.R. Fantappie, *Schistosoma mansoni* histone acetyltransferase GCN5: linking histone acetylation to gene activation, *Mol. Biochem. Parasitol.* 133 (2004) 131–135.
- [8] A.J. de Ruijter, A.H. van Gennip, H.N. Caron, S. Kemp, A.B. van Kuilenburg, Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family, *Biochem. J.* 370 (2003) 737–749.
- [9] F.J. Ramalho-Pinto, G. Gazzinelli, R.E. Howells, T.A. Mota-Santos, E.A. Figueiredo, J. Pellegrino, *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule in vitro, *Exp. Parasitol.* 36 (1974) 360–372.
- [10] S.R. Smithers, R.J. Terry, The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms, *Parasitology* 55 (1965) 695–700.
- [11] T.P. Yoshino, J.R. Laursen, Production of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts from mother sporocysts maintained in synxenic culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cells, *J. Parasitol.* 81 (1995) 714–722.
- [12] J. Sambrook, D.W. Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, 2001.
- [13] J.P. Huelsenbeck, F. Ronquist, MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees, *Bioinformatics* 17 (2001) 754–755.
- [14] D. Bahia, L. Avelar, R.A. Mortara, N. Khayath, Y. Yan, C. Noel, M. Capron, C. Dissous, R.J. Pierce, G. Oliveira, SmPKC1, a new protein kinase C identified in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345 (2006) 1138–1148.
- [15] S. Guindon, O. Gascuel, A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood, *Syst. Biol.* 52 (2003) 696–704.
- [16] F. Oger, B. Bertin, S. Caby, J. Dalia-Cornette, M. Adams, J. Vicogne, M. Capron, R.J. Pierce, Molecular cloning and characterization of *Schistosoma mansoni* Ftz-F1 interacting protein-1 (SmFIP-1), a novel corepressor of the nuclear receptor SmFtz-F1, *Mol. Biochem. Parasitol.* 148 (2006) 10–23.
- [17] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) e45.
- [18] B. Bertin, S. Sasorith, S. Caby, F. Oger, J. Cornette, J.M. Wurtz, R.J. Pierce, Unique functional properties of a member of the Fushi Tarazu-Factor 1 family from *Schistosoma mansoni*, *Biochem. J.* 382 (2004) 337–351.
- [19] D. Bahia, R. Mortara, J. Kusel, L.F. Andrade, F. Ludolf, P.R. Kuser, L. Avelar, J. Trollet, C. Dissous, R. Pierce, G. Oliveira, *Schistosoma mansoni*: expression of Fes-like tyrosine kinase SmFes in the tegument and terebratorium suggests its involvement in host penetration, *Exp. Parasitol.* 116 (2007) 225–232.
- [20] I.V. Gregoret, Y.M. Lee, H.V. Goodson, Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis, *J. Mol. Biol.* 338 (2004) 17–31.
- [21] R.L. De Mendonca, D. Bouton, B. Bertin, H. Escriva, C. Noel, J.M. Vanacker, J. Cornette, V. Laudet, R.J. Pierce, A functionally conserved member of the FTZ-F1 nuclear receptor family from *Schistosoma mansoni*, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 5700–5711.
- [22] C. Lu, W. Wu, E.G. Niles, P.T. Loverde, Identification and characterization of a novel fushi tarazu factor 1 (FTZ-F1) nuclear receptor in *Schistosoma mansoni*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 150 (2006) 25–36.
- [23] M.S. Finnin, J.R. Donigian, A. Cohen, V.M. Richon, R.A. Rifkind, P.A. Marks, R. Breslow, N.P. Pavletich, Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors, *Nature* 401 (1999) 188–193.
- [24] A. Vannini, C. Volpari, G. Filocamo, E.C. Casavola, M. Brunetti, D. Renzoni, P. Chakravarty, C. Paolini, R. De Francesco, P. Gallinari, C. Steinkuhler, S. Di Marco, Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 15064–15069.
- [25] E. Hu, Z. Chen, T. Fredrickson, Y. Zhu, R. Kirkpatrick, G.F. Zhang, K. Johanson, C.M. Sung, R. Liu, J. Winkler, Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 15254–15264.
- [26] J. Taplick, V. Kurtev, K. Kroboth, M. Posch, T. Lechner, C. Seiser, Homooligomerisation and nuclear localisation of mouse histone deacetylase 1, *J. Mol. Biol.* 308 (2001) 27–38.



Supplementary Fig. 1A. Molecular modelling of the active site and catalytic domain of SmHDAC8.

SmHDAC8 modelling was performed using the automated comparative protein modelling server SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) [S1] using human HDAC8 (PDB 1t64) as template. Molecular graphics images were produced using the UCSF Chimera package (University of California, San Francisco; <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) [S2]. Amino acid composition and positioning was compared between SmHDAC8 and hHDAC8 catalytic sites occupied by HDACi SAHA (Fig. 2A). Zn²⁺ is indicated (red ball). Amine functions are in blue and carboxylic functions in red.



Supplementary Fig. 1B. Surface of SmHDAC8 active site model was compared to the surface of the crystallized hHDAC8 active site (PDB 1t64) [26].

The catalytic site, occupied by the HDAC inhibitor SAHA, is indicated and major differences between surface structures are boxed.

K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling, *Bioinformatics* 22 (2006) 195–201.

E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, "UCSF Chimera – A Visualization System for Exploratory Research and Analysis." *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612.

Supplementary Table 1: Oligonucleotide primers used in the study

Gene	Primer Use	Sequence (5'-3')
SmHDAC1	5' RACE PCR primer - SmHDAC1GSP5'1	CTggggTggTggCCTCCATCATgC
	5' RACE PCR nested primer - SmHDAC1GSP5'2	gAggCATCAggATTCTgCTACATCAAT
	3' RACE PCR primer - SmHDAC1GSP3'1	CTTgTggAAACTAACggTCATCACTCTATC
	3' RACE PCR nested primer - SmHDAC1GSP3'2	CACCATCACCATgATgAATATCAATATCCA
	^a Full-length transcript 5' primer	
	Full-length transcript 3' primer	
	Quantitative Rt-PCR forward	<u>gCgAgTATTTTCCCggAACTg</u>
	Quantitative Rt-PCR reverse	<u>CgCgACCTgCACCAATATCT</u>
	Site directed mutagenesis – HD1H176-177A5	CAACACCATCACCAgCAgCAATATCAATATCCAC
	Site directed mutagenesis – HD1H176-177A3	gTggATATTgATATTgCTgCTggTgATggTgTTg
SmHDAC3	5' RACE PCR primer – SmHDAC3GSP5'1	gAgCCAAAgCTgggAAATACTACgC
	5' RACE PCR nested primer – SmHDAC3GSP5'2	gAAggCATTgATgACgATATgTATTC
	3' RACE PCR primer – SmHDAC3GSP3'1	CACAgCCAAgCgAATCAgCgCCAC
	3' RACE PCR nested primer – SmHDAC3GSP3'2	gTTgTTggTCgATAAAATgCAACTACg
	Quantitative Rt-PCR forward	TTTTACgATCCAgATTgTgggA
	Quantitative Rt-PCR reverse	CATgggATgATTCggTCCATA
SmHDAC8	5' RACE PCR primer – SmHDAC8GSP5'1	gTgATggAgTAgAAgAAgCTTTCTgg
	5' RACE PCR nested primer – SmHDAC8GSP5'2	gTAgTTACgTTCTCTTgTACATCATgC
	3' RACE PCR primer – SmHDAC8GSP3'1	CTTCTTCTAgTggCAAATTgAATgCCg
	3' RACE PCR nested primer – SmHDAC8GSP3'2	CgACCAgCgCCATTTAggAAAATCg
	Quantitative Rt-PCR forward	ggCATCAATgATTTggACTgg
	Quantitative Rt-PCR reverse	TCggCTCCgCATTgAACTAC
α -tubulin	Quantitative Rt-PCR forward	AgCAgTTAAgCgTTgCAgAAATCA
	Quantitative Rt-PCR reverse	TgACgAgggTCACATTTACCCAT

^a Restriction enzyme sites are in bold, start or stop codons are underlined.

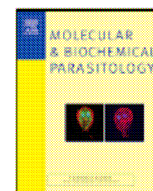
Supplementary Table 2. ESTs and genomic contigs encoding *S. mansoni* HDACs.

SmHDAC cDNA (size in bp)	EST (size in bp)	EST alignment	SmHDAC alignment	Genomic contig (Size in bp)	Number of exons	Gene size (bp)
SmHDAC1 (1761)	CD147439 (455)	1-455	298-753	Contig_001821 (25118)	7	8183
	TC7650 (876)	31-706	1094-1769			
SmHDAC3 (1732)	AI977521 (445)	8-445	156-593	Contig_0030172 (25039)	7 (1-7)	>14526
	TC19640 (288)	288-113	362-537	Contig_0030174 (8799)	5 (8-12)	
	BG930604 (275)	264-8	629-885			
	TC11029 (878)	32-878	923-1769			
SmHDAC8 (1473)	TC1871 (1625)	33-1625	1-1473	Contig_0029620 (23841)	5 (1-5)	6085
	TC9126 (468)	2-353	972-1323			



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular & Biochemical Parasitology



Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*

Florence Dubois^{a,b,c,1}, Stéphanie Caby^{a,b,c,1}, Frédéric Oger^{a,b,c,2}, Céline Cosseau^d,
Monique Capron^{a,b,c}, Christoph Grunau^d, Colette Dissous^{a,b,c}, Raymond J. Pierce^{a,b,c,*}

^a Inserm, U 547, Lille, France

^b Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

^c Institut Pasteur de Lille, IFR 142, 1 rue du Professeur A. Calmette, 59019 Lille, France

^d UMR 5244, CNRS EPHE Université de Perpignan, Equipe Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 May 2009

Received in revised form 4 June 2009

Accepted 5 June 2009

Available online 16 June 2009

Keywords:

Schistosoma mansoni

Histone deacetylase inhibitor

Apoptosis

Histone

Transcription

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

ABSTRACT

In order to explore the conservation/divergence of transcriptional regulation in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*, we are studying the structures and functions of transcriptional mediators and in particular histone-modifying enzymes. Reversible histone acetylation changes chromatin structure and modulates gene transcription. The removal of acetyl residues from histones and other proteins is catalyzed by histone deacetylases (HDACs) that are under increasing study as therapeutic targets, both in cancer and parasitic diseases. In order to determine the extent and importance of histone acetylation in *S. mansoni*, we tested the effects of three histone deacetylase inhibitors (HDACi) on both larval and adult worms in culture. Trichostatin A (TSA), valproic acid (VPA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) inhibited global HDAC activity at all life-cycle stages. TSA and VPA, but not SAHA, caused mortality of schistosomula and adults, with TSA showing the most rapid effect. Moreover, TSA caused an increase in apoptosis in schistosomula shown by the TUNEL assay and an increase in caspase 3/7 activity. Both TSA and VPA were shown to cause an increase in general levels of protein acetylation in schistosomes; more particularly of histone 4 whereas histone 3 acetylation was less affected. In the case of TSA treatment this histone hyperacetylation was correlated with the increased expression of caspases 3 and 7 transcripts. Finally, quantitative chromatin immunoprecipitation showed that the proximal promoter region of the *S. mansoni* caspase 7 gene was hyperacetylated on histone H4 after TSA treatment.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The post-translational modification of histone amino-terminal tails generates a complex regulatory system, the histone code [1] that determines the active or repressed state of chromatin. Acetylation or deacetylation of conserved lysine residues in histone tails represents a crucial element of this chromatin-based mechanism of transcriptional regulation. Broadly, acetylation, via histone acetyltransferases (HAT) annuls the positive charge of the lysine and reduces chromatin compaction, favouring transcription, whereas deacetylation, via histone deacetylases (HDACs) has the opposite effect [2]. However, acetylation is also one of the histone modi-

fications modulating the binding of multiprotein complexes that regulate transcription [1]. It is also an over-simplification to suggest that histone deacetylases are always associated with transcriptional repression [3]. The enzymes involved in these processes also have roles in the deacetylation of other proteins, actors in transcriptional complexes or in some cases, cytosolic proteins such as tubulin ([4] for review).

Histone deacetylases in eukaryotes have traditionally been divided into three classes I, II and III, with classes I and II including enzymes that share similar catalytic domains and a Zn²⁺-dependent catalytic mechanism. Class III comprises the enzymes related to yeast Sir2 (sirtuins) that are NAD⁺-dependent and phylogenetically unrelated to classes I and II. Recently, a separate class (IV) comprising only HDAC 11 in mammals was described [4]. In a preliminary study, we cloned and characterized three class I HDACs present in the *S. mansoni* genome, orthologues of mammalian HDACs 1, 3 and 8, and confirmed their identities by phylogenetic analysis [5]. Several class II HDACs have also been detected in the *S. mansoni* genome by homology searches, including potential orthologues of mammalian HDACs 4, 5, 6/10 and 9 (RP, unpublished).

* Corresponding author at: Inserm U 547, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur A. Calmette, 59019 Lille, France. Tel.: +33 320877783; fax: +33 320877888.

E-mail address: Raymond.Pierce@pasteur-lille.fr (R.J. Pierce).

¹ These authors contributed equally to the work.

² Present address: UMR CNRS 6026, Equipe SPARTE, Université de Rennes 1, IFR 140 GFAS, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex, France.

Inhibitors of class I and class II HDACs (HDACi) can be classed in four families according to their structure: short-chain fatty acids such as butyric acid derivatives including valproic acid (VPA), hydroxamic acid derivatives including trichostatin A (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), benzamides and cyclic tetrapeptides [6 for review]. Representatives of each of these families are currently in clinical trials against diverse cancers and IC₅₀ values for these inhibitors are generally in the μM or nM range. In cancer therapy HDACi have proved to have potent activities at concentrations that are minimally toxic to the host, although they do have side-effects [6]. The effects of HDACi are cell-type dependent and the molecular pathways engaged to mediate their effects are not fully elucidated. However, they are capable of inducing apoptosis via several pathways including death receptors (extrinsic pathway) [7], the mitochondrial pathway (intrinsic pathway) [8], selective activation of BH3-only proteins [9], or via the regulation of the production of reactive oxygen species [10]. Many HDACi can induce cell-cycle arrest at G1/S and they inhibit cancer vascularisation, possibly via the down-regulation of the expression of the chemokine receptor CXCR4 [11]. Finally, HDACi can enhance anti-tumour immunity, either by rendering malignant cells more visible to the immune system, or by altering immune cell activity and/or cytokine production [12].

Parasites, and particularly those that proliferate within the human host, can be likened to tumours in that they undergo intense metabolic activity that is outside the control of the host. Even parasites that do not proliferate within the host, such as schistosomes, have in common this intense metabolic activity and a high level of proliferation of the vitelline cells. HDACi and sirtuin inhibitors have therefore been tested for their activity against a variety of parasites.

The use of HDACi against malaria parasites started with the demonstration of the activity of apicidin (a cyclic tetrapeptide HDACi) in inhibiting growth of *Plasmodium falciparum* *in vitro* [13]. Subsequent work showed that trichostatin A (TSA) was also active *in vitro* and that suberic acid bisdimethylamide had a cytostatic effect on the murine malaria parasite *Plasmodium berghei* *in vivo* [13]. More recently, new compounds derived from L-cysteine or 2-aminosuberonic acid were designed to inhibit *P. falciparum* HDAC-1 (PfHDAC-1) based on homology modeling with human class I and class II HDAC enzymes [14]. These compounds showed a high antiproliferative activity in the nM range and some were much more toxic toward the parasites than toward mammalian cells. This work underlines the possibility of designing inhibitors with increased specificity toward HDACs of parasites.

Similarly, a variety of hydroxamic acid class HDACi including TSA and SAHA at nM concentrations were capable of inhibiting proliferation of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* *in vitro* and completely protected monolayers of HS68 cells against infection [15]. Moreover, in the case of the kinetoplastid parasite *Trypanosoma brucei*, an apicidin analogue has been shown to have potent and selective antiproliferative effects [16].

Here we describe preliminary studies aimed at determining the effect of HDACi on schistosomes and the potential of such compounds as schistosomicidal drugs. In particular, we have shown that the inhibitor of class I and class II HDACs, TSA, induces parasite mortality, apoptosis, hyperacetylation of histones and increased expression of selected genes.

2. Materials and methods

2.1. Parasites

A Puerto-Rican strain of *S. mansoni* was maintained in *Biomphalaria glabrata* snails and golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). Cercariae were released from infected snails and harvested on ice. They were then washed three times by resuspension in 30 ml of

Hank's Balanced Salt Solution (Invitrogen) in a corex tube (Corning) and centrifugation for 10 min at $1500 \times g$. Schistosomula were obtained *in vitro* [17] and were maintained in culture for up to 8 days under the conditions described below. Adult worms were obtained by whole-body perfusion of 6-week infected hamsters [18] and male and female worms separated manually. Eggs were obtained from the livers of infected hamsters and hatched out under light to obtain miracidia [19]. Primary sporocysts were obtained after overnight axenic culture of miracidia as described [19]. Parasite DNA was extracted from the free-living cercariae using standard methods [20]. Total RNA was extracted from all life-cycle stages using the guanidine thiocyanate/caesium chloride method [21].

2.2. Assay of HDAC activity in parasite extracts

Each life-cycle stage (100,000 miracidia, sporocysts, cercariae or schistosomula) or adult male worms (1000) were resuspended in 500 μl of cold lysis buffer (Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100 supplemented with a protease inhibitor cocktail (SigmaTM) and 1 mM PMSF) vigorously mixed by vortexing and homogenised in a Dounce homogeniser. Samples were centrifuged ($14,000 \times g$, 20 min 4°C) and the supernatant of each sample was removed and protein concentration measured using the BCA kit (PromegaTM). These extracts were conserved at -80°C .

A fixed quantity of extract from each life-cycle stage was used to estimate the HDAC activity using the HDAC Colorimetric Assay Kit (Alexis Biochemicals). It should, however, be noted that extracts of female worms were found to give a high background level in this colorimetric test due to the presence of pigment and were thus eliminated from the analysis. These tests were performed according to the conditions recommended by the supplier in 96-well microplates using 75 μg of each soluble protein extract diluted to 85 μl . The volume was completed to 95 μl with HDAC assay buffer and 5 μl of the colorimetric substrate were added to a final volume of 100 μl . The reaction was incubated at 37°C during 2 h. At the end of this incubation, 10 μl of Lysine Developer were added and the solutions were again incubated 30 min at 37°C . The sample was read in an ELISA plate reader (Labsystems Multiscan MS) at 405 nm. The positive control was performed using a HEK 293 cell extract prepared as for the parasite extracts. Under the same experimental conditions, the HDACi trichostatin A (TSA), suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) and valproic acid (VPA) (Sigma), were added to final concentrations of, respectively, 20 μM , 20 μM and 20 mM.

2.3. Treatment of schistosomula and adult worms with HDACi

In two separate 24-well plates, schistosomula (approximately 2000 per well) and adult worms (10 pairs per well) were maintained in 1 ml of M199 medium (Invitrogen) supplemented with 10% foetal calf serum (PAA Laboratories, GmbH), non-essential amino-acids (Gibco), penicillin/streptomycin, amphotericin and rifampicin (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma) at 37°C and 5% CO_2 . Stock solutions of TSA, SAHA and VPA (Sigma) were prepared according the supplier's recommendations and respectively dissolved in absolute ethanol, DMSO and sterile water. Every 24 h, schistosomula and adult worms were treated with two different doses of these HDACi to final concentrations of 1 and 2 μM for TSA, 2 and 10 μM for SAHA and 1 and 5 mM for VPA. Briefly, 800 μl of culture medium were removed from each well and 700 μl of fresh complete culture medium were added. The volume was completed to 1 ml with 100 μl of TSA or VPA solutions, prepared at $10\times$ concentration in complete M199 medium, to the desired final concentration. The negative controls correspond to schistosomula and adult worms treated with equivalent amounts of absolute ethanol for the TSA control, DMSO for the SAHA control and with sterile water for the VPA control.

For ChIP and measurement of transcript levels of target genes 20,000 schistosomula were incubated in wells of a 6-well culture plate containing 2 ml of complete M199 medium (as above) containing 2 μ M TSA or solvent (ethanol) alone as above. After 12, 24 or 48 h parasites were recovered by centrifugation, washed once in PBS and subjected either to RNA extraction using the Ribopure kit (Ambion) or to the ChIP protocol (see below). Extracted total RNA was treated with Turbo DNA-free (Ambion) and an aliquot (one twentieth of the sample) reverse transcribed using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) using oligo-dT as primer.

2.4. Estimation of worm viability

The viability of schistosomula was visually estimated on a daily basis using an optical microscope (Leica DMIL) following the distinct morphological differences between dead and viable schistosomula. Loss of mobility, obvious tegumental deformation and a granular appearance were the main criteria. For each condition, an aliquot of approximately 150 larvae was observed and the non-viable larvae were counted. Three counts were independently performed for each experiment.

2.5. Measurement of caspase activity

Caspase 3/7 activity was measured using the Caspase-Glo 3/7 assay kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. Briefly, schistosomula (20,000) were treated or not with TSA (solvent control, 2 or 10 μ M) as previously and plates (6-well) allowed to equilibrate to room temperature for 5 min before proceeding. Culture medium was removed and the schistosomula were centrifuged (1000 \times g, 5 min) washed once in PBS and resuspended in 100 μ l of reporter lysis buffer (1 \times , Promega) in a 1.5 ml eppendorf tube. Parasites were mixed briefly (vortex) and centrifuged (14,000 \times g, 10 min, 4°C). Caspase-Glo reagent (100 μ l) was then added to the supernatant, the solutions mixed briefly by vortexing and incubated at room temperature in the dark with agitation for 3 h. A negative control was performed using 100 μ l of lysis buffer alone. It was not found necessary to disrupt the schistosomula further by sonication before carrying out the assay. Luminescence was measured in a white-walled 96-well plate in a Wallac Victor² 1420 multilabel counter (PerkinElmer[®]).

2.6. TUNEL assay

Detection of DNA strand breaks in TSA-treated schistosomula was done using the Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL) method using the *In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche). The method designed for cell suspensions was followed as described in the manufacturer's instructions with modifications. Briefly, batches of 2000 schistosomula, were treated or not for 48 h with 2 or 10 μ M TSA, or for 24 h with 5 or 50 μ M staurosporine (Sigma), in a 6-well micro-plate in 2 ml of M199 medium as previously. Culture medium was removed and the schistosomula were centrifuged (1000 \times g, 5 min) washed three times in PBS; 100 μ l of fixation solution (paraformaldehyde, 2% final) was added to the parasite pellet and incubated at room temperature for 60 min. The liquid was then removed, the schistosomula washed once in PBS (500 μ l) and permeabilization solution (Triton X-100 0.1%, sodium citrate 0.1%) added for 10 min on ice. Labelling was then carried out exactly as described in the manufacturer's instructions. Positively labelled schistosomula were counted manually under fluorescence microscopy.

2.7. Western blot analysis

Schistosomula (approximately 2000) and adult worms (10 worm pairs) were washed twice in cold PBS 1X. For the schis-

tosomula, the pellet was directly resuspended in 100 μ l protein loading buffer (62.5 mM Tris/HCl pH 6.8; 3% SDS; 10% sucrose; 0.2 M DTT), sonicated six times for 15 s, boiled and centrifuged (5 min; 14,000 \times g; 4°C). Adult worms were resuspended in 200 μ l of lysis buffer (PBS containing 0.5% Triton X-100, 2 mM PMSF, 0.02% Na₃N) and sonicated six times for 15 s. The samples were centrifuged (10 min; 14,000 \times g; 4°C), the supernatants removed and the pellets (containing the nuclear material) were resuspended in 100 μ l protein loading buffer then subjected to the same preparation as described for schistosomula. For schistosomula and adult worms, 20 μ l of sample were loaded on 15% SDS-polyacrylamide gels. After protein separation, the transfer to a nitrocellulose membrane (Interchim) and western blot analysis were performed according to antibody supplier's recommendations. Acetylation levels of histones H3 and H4 were visualized using polyclonal rabbit anti-acetyl-H3 and anti-acetyl-H4 antibodies (ChIP grade, Upstate). Briefly, membranes were blocked with Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 and 5% skimmed milk (TBST/5% milk) and then probed overnight with primary antibodies (1:2000 anti-acetyl-H3 or 1:10,000 anti-acetyl-H4 in TBST/5% BSA). Membranes were then washed three times with TBST and incubated for 1 h in TBST/5% milk containing the corresponding peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10,000). After washing in TBST, ECL (Amersham Biosciences) was used to visualize the bands.

Each western blot analysis was calibrated by silver-staining a 15% SDS-polyacrylamide gel loaded with the same samples using the SilverQuest kit (Invitrogen).

2.8. Molecular cloning of *S. mansoni* caspases 3 and 7

Screening (tblastn) of the *S. mansoni* gene index database (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/Blast/index.cgi>) using mouse caspase 3 (NP_033940) and caspase 7 (NP_031637) peptide sequences yielded two contigs and one individual EST that represented potential orthologues (TC38656, TC43170, CD81649). We carried out 5' and 3' RACE (GeneRacer kit, Invitrogen) using oligonucleotides based on these sequences (Table 1 in Supplementary Online Material) and generated full-length cDNA sequences, the integrity of which was verified by performing PCR with oligonucleotides encompassing the coding sequence. Sequence alignments and analysis were carried out using the DNASTar Lasergene programme package and the BioEdit v7.0.1 package (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). The predicted peptide sequences were further compared to putative *S. mansoni* proteins identified on the *S. mansoni* GeneDB (<http://www.genedb.org/genedb/smansonii/>). The structure of the corresponding genes and localisation of proximal promoter sequences was done by alignment to genomic contig and scaffold sequences (assembly 3.1) at the Sanger Institute *S. mansoni* Blast server (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/bblast/submitblast/s_mansoni).

2.9. Quantitative RT-PCR

Total RNA (one twentieth of the RNA extracted from 20,000 schistosomula; see Section 2.3) was reverse transcribed using the Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). cDNA were used as templates for PCR amplification using the SYBR Green Master Mix and the ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems). Primers (Table 1 in Supplementary Material Online) specific for *S. mansoni* α -tubulin (Genbank accession number M80214; [22]), SmHDAC1, SmHDAC3, Smcaspase 3 and Smcaspase 7, were designed by the Primer Express Program (Applied Biosystems) and used for amplification in triplicate assays. In order to determine the efficiency of the PCR reactions with each primer pair, Ct values were obtained for cercarial cDNA in amounts rang-

ing from 40 pg to 100 ng. The standard curves obtained (not shown) showed high linearity (Pearson correlation coefficient $r > 0.99$). The real-time PCR efficiency (E) of one cycle in the exponential phase was calculated according to the equation: $E = 10^{-1/|slope|}$ [23]. The investigated transcripts all showed very high and comparable efficiency rates; SmHDAC1, 2.03; SmHDAC3, 2.00; Smcaspase 3, 2.04; Smcaspase 7, 1.99; and *S. mansoni* α -tubulin, 2.00. For graphical representation of quantitative PCR data, Δ Ct values were obtained by deducting the raw cycle threshold (Ct values) obtained for α -tubulin mRNA, the internal standard, from the Ct values obtained for SmHDAC1, SmHDAC3, Smcaspase 3 and Smcaspase 7 in schistosomula treated or not with TSA. The efficiency rates of the PCR reactions allow the ratios of expression to be calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ratio [24].

2.10. Quantitative chromatin immunoprecipitation (Q-ChIP) and ChIP-Seq

The method used for Q-ChIP was recently described in detail [25]. Briefly, parasites treated or not with TSA were fixed in 1% formaldehyde and sonicated to fragment the chromatin. Immunoprecipitation was carried out using rabbit anti-acetyl histone H4 serum (ChIP grade, Upstate), with non-immunised rabbit serum or rabbit antiserum against human lactoferrin (Sigma) as controls. Q-PCR was carried out as described [25] on immunoprecipitated DNA or input using oligonucleotide primers shown in Table 1 in Supplementary Material Online and results expressed as the fold increase in the percentage of input immunoprecipitated from DNA derived from schistosomula treated with TSA compared to untreated larvae.

ChIP-Seq was performed as described in [26] with antibodies against acetylated H3K9 (Upstate, Cat#31388, Lot#DAM1394804). To correct for potential artifacts during data processing for peak finding, DNA was treated by micrococcal nuclease to obtain mononucleosomes, and this DNA that corresponds to the input was extracted, sequenced and processed as for ChIP-Seq (alignment with ELAND (Illumina) and peak finding with FindPeaks 3.1 [27]). Profiles were visualized in GBrowse [28] and compared by visual inspection.

2.11. Statistical analysis

The statistical significance of the data in all experiments was measured using the Mann–Whitney U -test for nonparametric data or Student's t -test using the programme StatView (Abacus Concepts).

3. Results and discussion

3.1. Schistosome histone deacetylases are inhibited by TSA, VPA and SAHA

We initially tested three commonly used histone deacetylase inhibitors (HDACi) for their capacity to inhibit global HDAC activity in schistosomes (Fig. 1). Overall HDAC activity is very uniform throughout the schistosome life-cycle, although slightly increased in adult male worms (Fig. 1A) and is 2–3-fold lower than that of homogenates of HEK 293 cells. This activity is strongly inhibited by 20 μ M TSA at all life-cycle stages. Lower doses of TSA were also effective (not shown); 10 nM TSA inhibited adult male worm HDAC activity by 70% in the same assay conditions. We next compared the inhibition of adult male worm and schistosomula HDAC activity by TSA, VPA and SAHA (Fig. 1B). All three agents inhibited the HDAC activity strongly (70–90%), but not completely in HEK 293 cells, schistosomula and adult male worm extract.

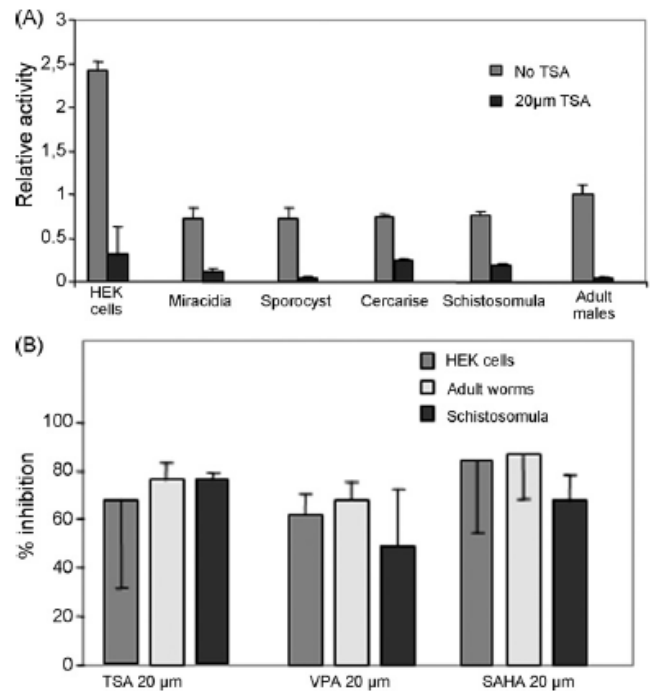


Fig. 1. Class I and class II histone deacetylase activity of *S. mansoni* life-cycle stages and inhibition by TSA, VPA and SAHA. (A) HDAC activity at different life-cycle stages. Activity was measured (see Section 2) on the different extracts (75 μ g of protein) in the presence or absence of TSA (20 μ M). An HEK 293 cell extract was included as a positive control and results are the means (\pm S.D.) of triplicate assays and are expressed as activity relative to that of adult male worm extract. (B) Inhibition of HDAC activity by TSA, VPA and SAHA. Activity was measured as before in the presence or absence of TSA (20 μ M), SAHA (20 μ M) or VPA (20 mM) in adult male worm extract and HEK 293 cell extract. Results are expressed as the mean (\pm S.D., triplicate assay) % inhibition obtained.

The incomplete inhibition of HDAC activity in schistosome extracts by the inhibitors used may be explained by their differential efficacy against HDAC classes I and II, or against individual HDACs. Although TSA has been shown to be an effective inhibitor of both class I and class II HDACs [29] it is significantly less potent against HDAC8 (class I) than against all other HDACs. This may be linked to recent findings indicating that, in contrast to all other class I and class II HDACs, the divalent cation present in the catalytic centre of HDAC8 may be Fe(II) and not Zn²⁺ [30]. Interestingly, we have shown that SmHDAC8 transcripts are highly expressed at all life-cycle stages and always expressed at higher levels than those of another class I HDAC, SmHDAC3 and at similar levels to SmHDAC1 [5]. Moreover, SmHDAC8 possesses insertions in its catalytic domain that may alter both its substrate specificity and inhibition profile. Valproic acid has also been shown to be a less effective inhibitor of class II than of class I HDACs [31]. Finally, we cannot rule out residual sirtuin (HDAC class III) activity in the extracts, catalyzed by endogenous NAD⁺ and that would not be inhibited by the HDACi we used.

3.2. Histone deacetylase inhibitors induce mortality and apoptosis in schistosomula

We next tested the HDACi for their capacity to affect schistosome larvae maintained in culture. A recent study [32] has shown that TSA is able to block the development of *S. mansoni* miracidia into sporocysts *in vitro*, and that this effect was completely reversible up to 4 h of incubation. We therefore determined to test the longer term effects of HDACi in culture with an emphasis on the viability of worms. Both TSA and VPA were toxic for schistosomula and Fig. 2A shows the phenotype obtained (opaque and immobile larvae) with

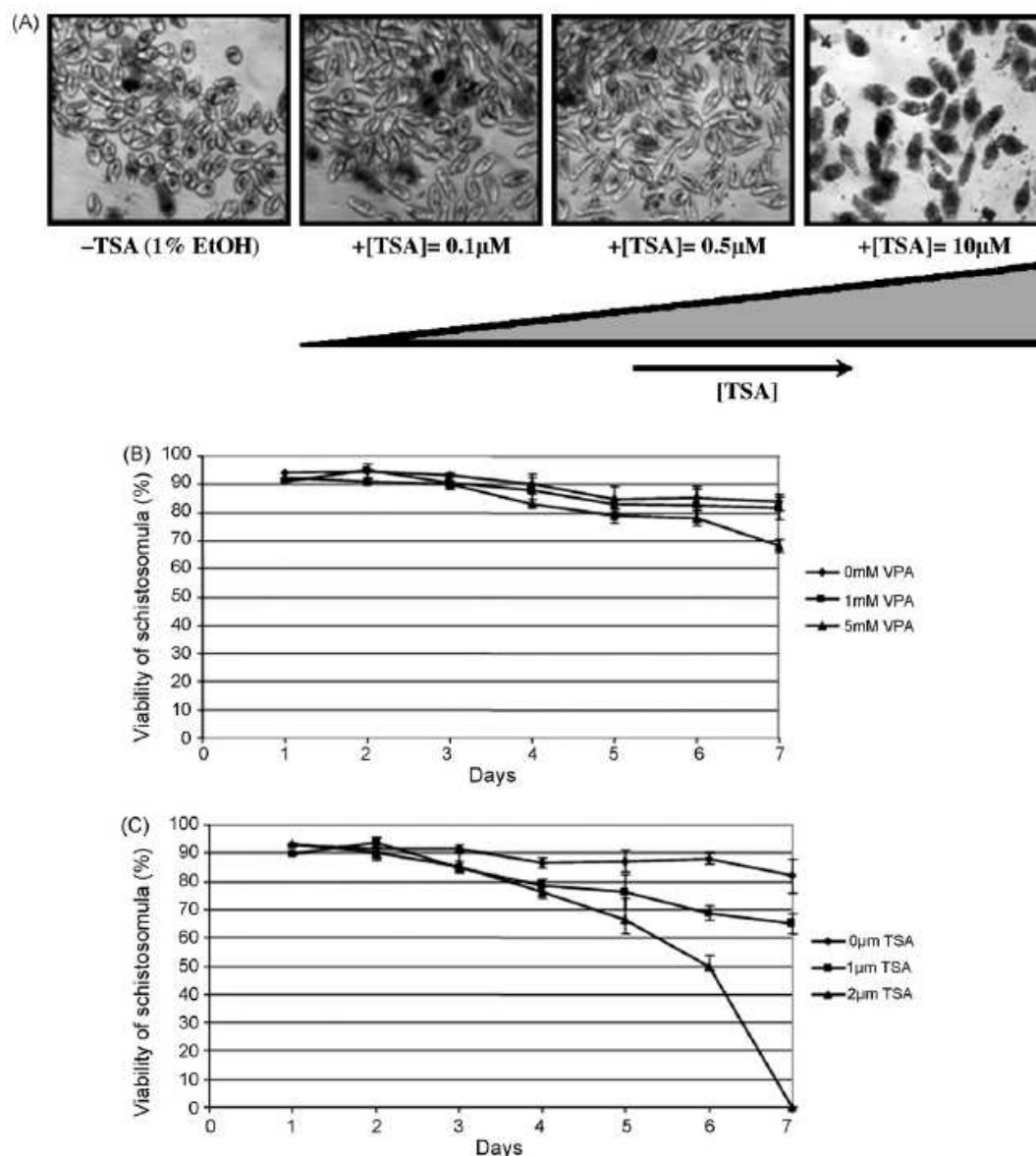


Fig. 2. Viability of schistosomula cultured *in vitro* in the presence of HDACi. (A) Appearance of schistosomula incubated in the presence of increasing concentrations of TSA for 48 h. Dead and dying larvae are dark and opaque. (B) Viability of schistosomula maintained in culture in the presence or absence of 1 or 5 mM VPA or (C) 1 or 2 μM TSA. Mortality was assessed as above and dead larvae were counted manually in cultures maintained up to 7 days. Results are expressed as mean % surviving larvae (\pm S.D., triplicate assay). Significant mortality compared to controls (Student's *t*-test) was induced by both doses of TSA from day 3 onwards and by 5 mM VPA from day 6.

increasing doses of TSA. The cumulative effect on larval survival over time is shown in Fig. 2B and C with schistosomula maintained in culture for 7 days and a daily renewal of the medium and the inhibitor. TSA (Fig. 2C), at the doses used was clearly more potent than VPA (Fig. 2B), killing all the larvae after 7 days. Up to 48 h after the start of the experiment, no effect on mortality was seen using 1 or 2 μM TSA. Significant mortality compared to untreated controls was induced by both doses after 3 days ($p=0.003$ for 1 μM TSA and $p=0.049$ for 2 μM TSA). In the case of VPA, significant mortality was only induced after 6 and 7 days at the 5 mM dose ($p=0.027$ and $p=0.001$, respectively). The time-frame of 48 h was chosen for subsequent experiments on the effects of TSA and VPA. In contrast, SAHA was ineffective against cultured schistosomula up to a concentration of 10 μM (not shown). This may be due to the failure of the drug to penetrate the double membrane of the larvae or to a lower efficacy of SAHA compared to TSA for example, as is the case for their relative cytotoxicity for cancer cell lines [e.g.

33]. However, the doses of TSA necessary to induce mortality were greater than those routinely used (100–300 nM) with cancer cell lines [33] also indicating a reduced bioavailability in schistosomula. The doses of VPA employed here are similar to those that induce cytotoxicity in cancer cells [e.g. 34] but are, again, less effective on schistosomula.

One of the principal effects of HDACi on cultured cancer cells is the induction of apoptotic cell death. In order to determine whether the mortality we observed was due to this mechanism, we used two methods that assayed different stages of the apoptotic process, caspase 3/7 activity and DNA fragmentation. Caspases 3 and 7 are “executioner” caspases that are cleaved and activated by caspases 8 and 9, the “initiator” caspases that are activated by both extrinsic and intrinsic death pathways [35]. Both caspases 3 and 7 are conserved in *S. mansoni* (see below). Caspase 3/7 activity showed no significant increase after 24 h of incubation with TSA (not shown), but was significantly increased after 48 h of incubation of schistosomula.

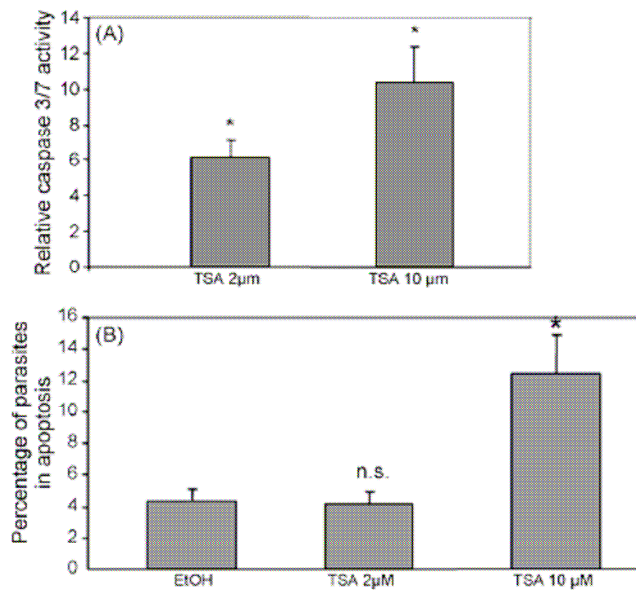


Fig. 3. TSA induces apoptosis in schistosomula *in vitro*. (A) Caspase 3/7 activity in schistosomula maintained *in vitro* in the presence of TSA. Schistosomula (20,000) were maintained in the presence of 2 or 10 μM TSA or with the same volume of the solvent ethanol (EtOH) added to the medium for 48 h. Caspase 3/7 activity was then measured (see Section 2). Results are the mean (\pm S.D.) of three independent experiments and are expressed as activity relative to the solvent control. (B) DNA fragmentation measured using the TUNEL method. Schistosomula were incubated as above and TUNEL labelling carried out as described in Section 2. Fluorescently labelled larvae were counted manually and results expressed as a percentage of total larvae. Results are the mean (\pm S.D.) of four independent experiments. For the caspase and TUNEL assays the statistical significance (Mann and Whitney test) is given as n.s. (not significant) or * $p < 0.05$.

mula (three independent experiments) with either 2 μM ($p = 0.019$) or 10 μM TSA ($p = 0.0065$) in a dose-dependent manner (Fig. 3A).

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL) was used to identify schistosomula containing cells in the last phase of apoptosis and positively stained larvae were counted manually. In four independent experiments significant ($p = 0.019$) labelling was only seen after 48 h when 10 μM TSA was used (Fig. 3B). However, labelling was seen in some schistosomula treated with 2 μM TSA. Although the number of labelled parasites treated with 2 μM TSA was not significantly different from controls, the apparent intensity of labelling was increased, and increased further at the higher dose of TSA (Supplementary Fig. 1A). Control experiments carried out using 50 μM staurosporine showed that all schistosomula gave positive TUNEL staining after 24 h of incubation (Supplementary Fig. 1B).

Taken together, our results show that HDACi are capable of inducing parasite mortality via an apoptotic mechanism. At the dose of 2 μM TSA did not induce mortality or a significant increase in TUNEL positive parasites after 48 h, but the caspase 3/7 activity was significantly increased at this point, indicating that the apoptotic process had started.

3.3. TSA treatment of schistosomula induces hyperacetylation of histone H4

The induction of apoptosis in cancer cells by HDACi including TSA is accompanied by an increase in the acetylation of histones [e.g. 36]. This hyperacetylation occurs on all the nucleosome histone subunits and most of the resulting acetylated lysine residues can be associated with increased gene transcription [37]. However, the acetylation of the histone H4 tail plays the most prominent role in determining the ability of chromatin to fold into higher order structures and in particular, the acetylation of lysine 16 of

H4 (H4K16) is a critical determinant of a relaxed chromatin structure, associated with active gene transcription [2]. In addition, the association of modified specific lysine residues of histone H3 at gene promoters is associated with gene activation or repression. For example, H3K9 acetylation, associated with trimethylated H3K4 is the signature of an active *var* gene locus in *P. falciparum* [38]. In order to determine the molecular correlates of the induction of apoptosis in schistosomes we therefore investigated the induction of histone hyperacetylation by HDACi, focusing on histones H3 and H4. Both histones show an extremely high level of sequence conservation in *S. mansoni*. Histone H4 (Sm06454; <http://www.genedb.org/genedb/smansoni/>) shows 100% sequence identity with mouse H4 and histone H3 (Smp_089860) shows only three amino-acid changes (in 136 residues, not shown) none of which concern the epitope recognized by the commercial antibody.

Levels of histone acetylation following treatment of schistosomula and adult worms with TSA and VPA were investigated at different doses and exposure times. Western blotting of treated worms was done using antibodies directed against acetylated histones H3 and H4 (Fig. 4). In both larvae (Fig. 4A) and adults (Fig. 4B) not incubated with the HDACi, H3 acetylation was more intense than that of H4, and increased slightly after 24 h of incubation with TSA or VPA. Acetylated H4 was present in untreated schistosomula after 24 h, but diminished after 72 h, even in worms treated with VPA. In adults, H4 acetylation was diminished substantially (not visible on blots exposed to visualize acetylated H4 in TSA-treated worms) after 24 and 72 h in untreated or VPA-treated worms. The relative diminution of H4 acetylation in untreated schistosomula after 3 days in culture (this was also the case after only 2 days, not shown) is most likely due to epigenetic changes involved in the maturation and development of schistosomula in *in vitro* culture, but the results shown do not imply its total absence and it remains to be determined whether similar changes occur *in vivo*. The most striking effect of TSA treatment was a sustained increase in H4 acetylation after 24 and 72 h of treatment, both in larvae and adult worms. This hyperacetylation was also sustained in worms after 5 days of incubation (not shown), in spite of the toxic effects of 2 μM TSA manifest at this time point (Fig. 2B).

3.4. TSA increases the expression of HDAC target genes and H4 acetylation of a target gene promoter

Increased acetylation of chromatin induced by HDACi is often accompanied by the increase in transcription levels of genes normally repressed by HDACs. For instance, TSA treatment of embryonic stem cells up-regulates the expression of HDAC1 and of its target genes (JunB, p21, etc.) [3]. However, it has also been shown that butyrate and TSA can mediate a decrease in histone acetylation at certain proximal promoters and in particular around the transcription start sites, and a corresponding down-regulation of associated genes [39]. We therefore decided to study the effects of TSA on the expression of selected genes and the correlation of these effects with the level of acetylation of their proximal promoters.

We looked for *S. mansoni* genes, orthologues of genes of which transcription has been shown to be modified by treatment with HDACi. These include genes that promote apoptosis such as APAF1 [40], or inhibit it such as JunB [41,3]. However, clear orthologues of these genes proved difficult to identify in the *S. mansoni* genome. Since we had shown that caspase 3/7 enzyme activity was increased after TSA treatment of schistosomula, and since caspase 3 transcripts were up-regulated in HCT116 cells expressing the transcription factor E2F1 during apoptosis promoted by SAHA [40] and in LNCaP prostate cancer cells after treatment with VPA [42], we investigated the possible regulation of caspases 3 and 7 transcription after TSA treatment. Initially we identified *S. mansoni* ESTs showing significant sequence identity to mouse caspases 3 and 7

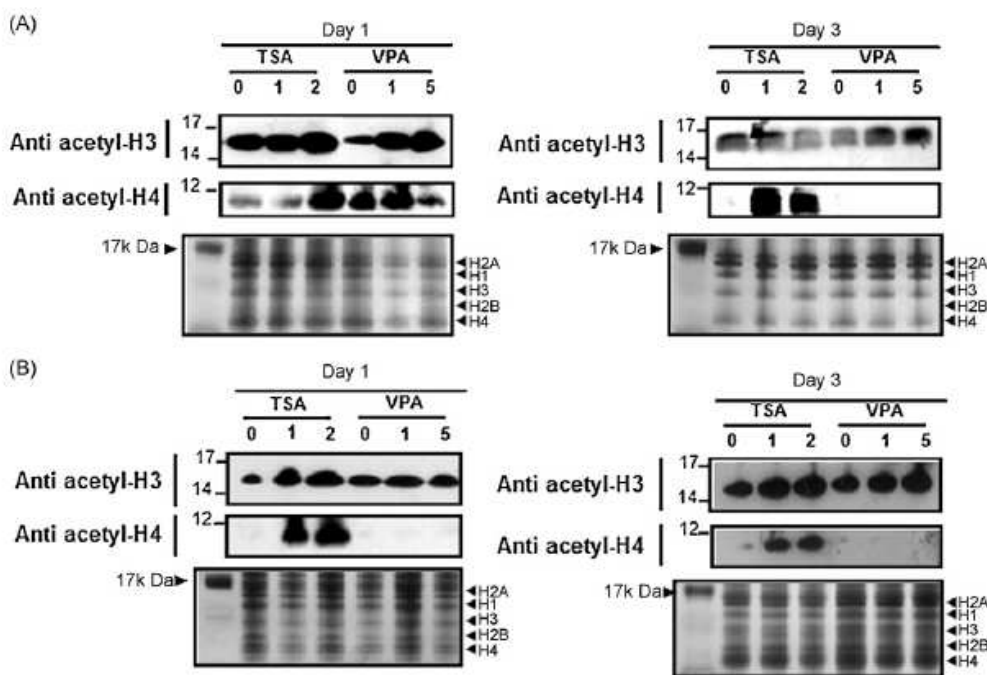


Fig. 4. HDAC inhibitors induce hyperacetylation of histone H4 in schistosomula and adult worms. Western blots of extracts of (A) schistosomula or (B) adult worms incubated for 1 or 3 days in the presence of different doses of TSA (0, 1 or 2 μM) or VPA (0, 1 or 5 mM) were carried out using antibodies to acetylated histone H3 or acetylated histone H4 (see Section 2). Silver-stained gels of the same extracts are shown as a control of input. The putative positions of the different histones are shown on the right of the panel. Molecular sizes indicated are in kDa.

(see Section 2) and completed the cDNA sequences using 5' and 3' RACE. These sequences have been submitted to GenBank with the accession numbers FJ905905 and FJ905906. The alignments of the respective catalytic domains of *Smcaspase 3* and *7* to orthologues are shown in Supplementary Fig. 2.

The analysis of transcription levels of these caspases showed that they were both up-regulated at 24 h in response to TSA treatment of schistosomula (Fig. 5A). In an initial study of the time-course of this activation of transcription, increased *Smcaspase 3* transcription was transient, being manifest only after 24 h and returning to the level of controls after 48 h. In contrast, *Smcaspase 7* transcription was already significantly increased after 12 h and continued to increase after 24 and 48 h of TSA treatment.

We next compared the expression of *SmHDAC1* (potentially up-regulated [3]) in schistosomula treated with TSA for 24 h in comparison to that of *SmHDAC3* [5] and the caspases (Fig. 5B). Importantly, average Ct values obtained for the α -tubulin reference gene were unchanged after 24 h of TSA treatment (not shown). After 24 h of incubation, in three independent experiments, *SmHDAC1* transcripts were found to be slightly down-regulated in treated parasites, although the overall change, compiling the three experiments, was not significant ($p = 0.09$). *SmHDAC3* transcript levels were unchanged ($p = 0.86$). In three separate experiments *Smcaspase 3* transcripts were up-regulated about 2-fold ($p = 0.002$), whereas *Smcaspase 7* transcripts were up-regulated 4–6-fold ($p = 0.0003$). The induction of apoptosis via the caspase-dependent pathway is not dependent on increased transcription of the corresponding genes, but rather on the activation through cleavage of pre-existing pro-caspase enzymes [35]. However, our study and others show that when transcription levels of caspase genes are measured [40,42], they are found to be modulated by HDAC inhibitors.

The overall increase in histone acetylation observed after TSA treatment in our study and others [36] may not reflect a corresponding increase at the proximal promoter. Indeed, the opposite has also been observed [39]. We therefore used quantitative chro-

matin immunoprecipitation (QChIP) that we previously optimized for use with whole schistosomes [25] in order to investigate levels of H4 acetylation around the transcription start sites (TSS) of the most markedly up-regulated gene encoding *Smcaspase 7*, and of *SmHDAC1*, the transcription of which was unaffected by TSA treatment. In order to define the corresponding gene promoter regions, we mapped the full-length cDNA sequences defined here for the *S. mansoni caspase 7* gene, and previously for *SmHDAC1* [4] to the genomic contigs and scaffolds available at http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_mansoni. This analysis ([25] and Tables 2 and 3 in Supplementary Material Online) allowed us to define oligonucleotides amplifying the regions from -50 to -1 for *Smcaspase 7* and from +49 to +133 for *SmHDAC1* (spanning exon 1 and the first intron) for use in quantitative real-time PCR following the ChIP procedure. It should be noted that the choice of these oligonucleotides was constrained by the presence of repetitive sequences, particularly for *SmHDAC1*, upstream of the transcription start site. Our results (Fig. 5C) show that, whilst the level of H4 acetylation at the *SmHDAC1* gene was unaffected by TSA treatment (in agreement with the lack of an effect on transcription), that of the *Smcaspase 7* promoter was increased 2–4-fold ($p = 0.002$) in three independent experiments. However, in terms of the percentage of input recovered after immunoprecipitation with antibodies to acetylated H4, the levels of acetylation at the *SmHDAC1* gene were much higher (21.1%) than those of the *Smcaspase 7* promoter (1.7%) without treatment, and remained unchanged (20.5%, $p = 0.63$) after treatment, possibly because the promoter is already maximally acetylated in untreated schistosomula. In support of this hypothesis, data from ChIP-Seq experiments carried out on material immunoprecipitated by an antibody against acetylated H3K9 [26] (Supplementary Fig. 3) indicates a large peak of H3K9 acetylation at the promoter of *SmHDAC1* in untreated cercariae, miracidia and adult worms. In contrast, H3K9 acetylation levels at the *Smcaspase 7* promoter were much lower in untreated parasites. This is also in agreement with the high constitutive level of expression of *SmHDAC1* we observed throughout the *S. mansoni* life-cycle [5].

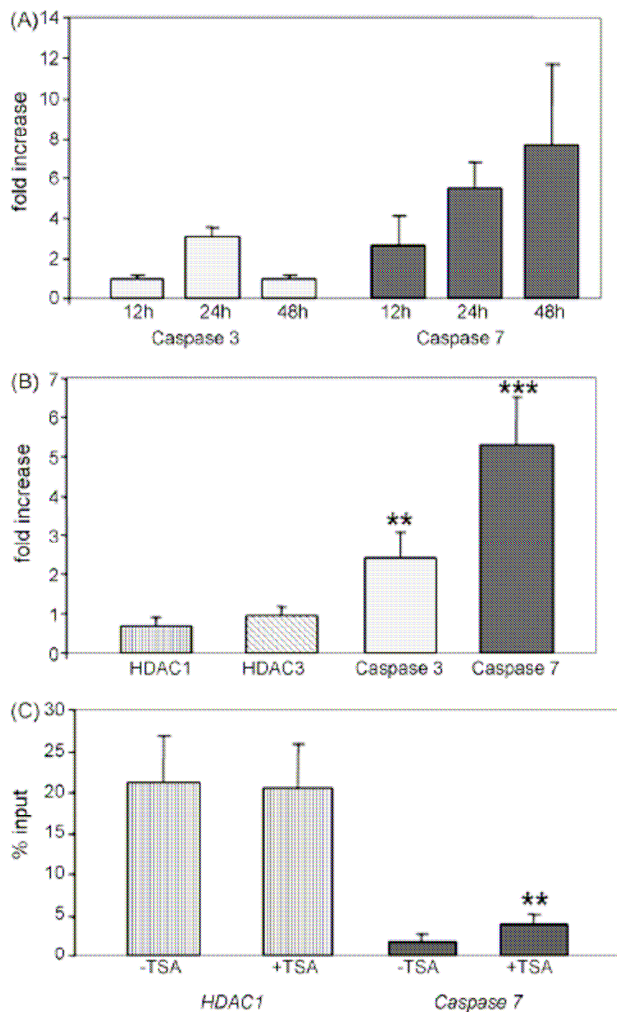


Fig. 5. TSA treatment increases transcription of *S. mansoni* caspases 3 and 7 genes and acetylation of H4 at the promoter of *Smcaspase 7*. (A) Time-course of the increase in expression of *Smcaspases 3* and *7* transcripts following treatment with TSA. *Schistosomula* (25,000) were incubated for 24 h in the presence or absence of 2 μ M TSA. RNA extraction, reverse transcription and quantitative real-time PCR were as described in Section 2. Oligonucleotides were as shown in Table 1 in Supplementary Online Material. Results are expressed as fold difference of transcript levels in TSA-treated compared to untreated schistosomula measured by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ratio using α -tubulin as the reference gene. (B) Relative expression levels of SmHDAC1, SmHDAC3, *Smcaspase 3* and *Smcaspase 7* transcripts in schistosomula treated with TSA for 24 h. Experiments were carried out exactly as in (A). (C) Relative levels of histone H4 acetylation at the promoters of SmHDAC1 and *Smcaspase 7* after treatment of schistosomula with TSA for 24 h. *Schistosomula* were incubated with or without 2 μ M TSA for 24 h as above and Q-ChIP carried out as described in [25] and Section 2. Results are expressed as the percentage of input DNA immunoprecipitated by anti-acetylated H4 antibodies from TSA-treated schistosomula and from controls. In all experiments in this figure the results shown are of three independent experiments. The statistical significance (Mann and Whitney test) is given as: ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$.

Taken together, our results show that TSA treatment increases histone acetylation, increases the expression of selected genes and that this increased expression can be correlated to an increase in the acetylation of H4 at the proximal promoter. These methods and data provide a template for the further investigation of the effects of HDAC inhibitors on the parasite, with the aim of developing schistosome-specific inhibitors as novel drug candidates. However, the methods developed in this study will also enable us to further investigate the epigenetic control of gene expression during the parasite life-cycle and in response to inhibitors/agonists of other histone-modifying enzymes. This complex life-cycle includes radical morphological modifications, sexual differentiation, two forms

of reproduction, and numerous genes are subject to strict control of their expression, being switched on or off at different stages (e.g. [43]). These parameters argue for a central role for epigenetic mechanisms of gene expression and make *S. mansoni* an interesting, novel and, now, an accessible model for their study.

Acknowledgements

The work was supported by Inserm (U547), the Institut Pasteur de Lille, the CNRS and the ANR (grant number ANR-07-BLAN-0119-02 2008-10, programme Schistophepigen). FD was supported by the MENRT and FO was supported by Inserm-Region Nord-Pas de Calais. Illumina/Solexa high-throughput sequencing was carried out at the OSU CGRB (Oregon, USA) core facility with the help of Michael Freitag, Mark Dasenko, Steve Drake and Christopher Sullivan.

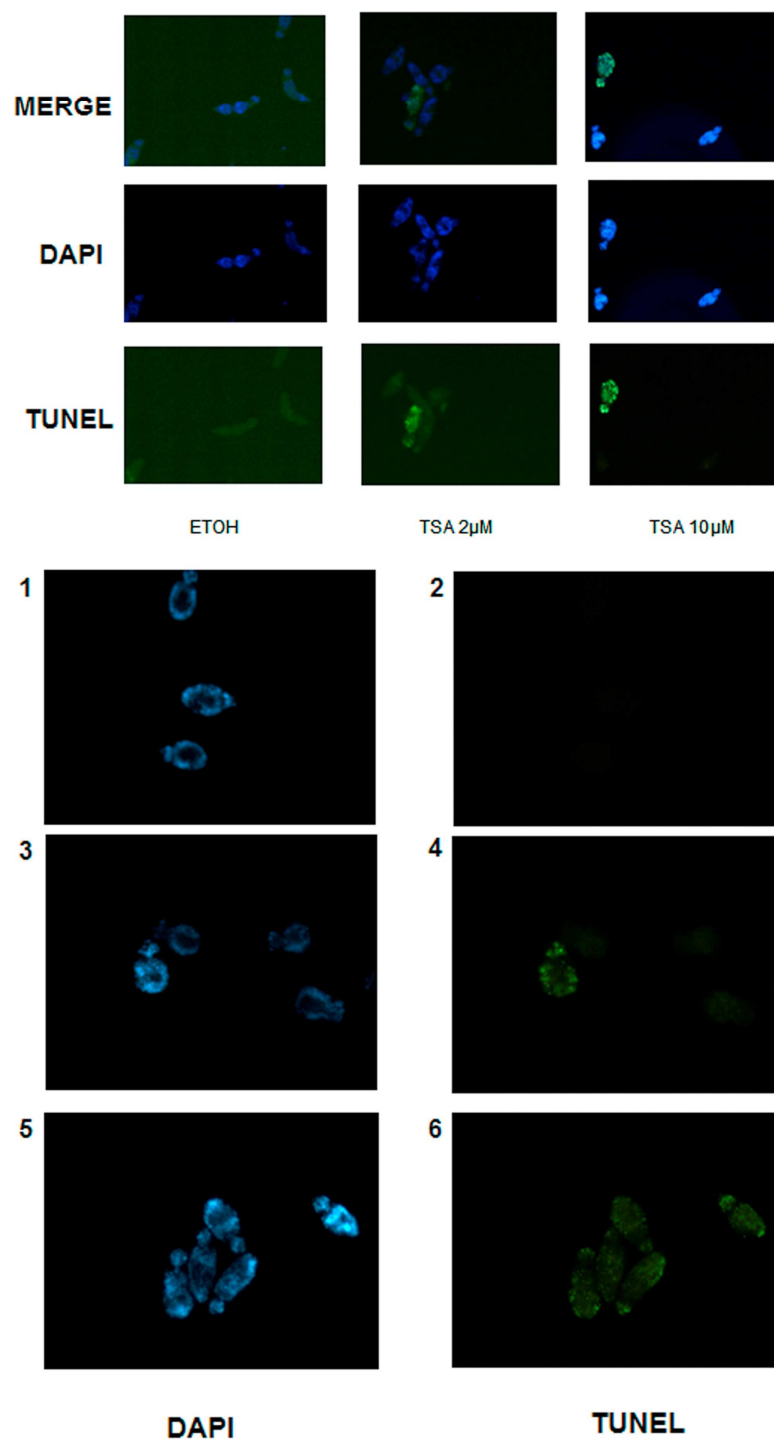
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.molbiopara.2009.06.001.

References

- [1] Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000;403:41–5.
- [2] Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 2007;76:75–100.
- [3] Zupkovitz G, Tischler J, Posch M, et al. Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* 2006;26:7913–28.
- [4] Gregoret IV, Lee Y-M, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* 2004;338:17–31.
- [5] Oger F, Dubois F, Caby S, et al. The *Schistosoma mansoni* class I histone deacetylases. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;377:1079–84.
- [6] Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Disc* 2006;5:769–84.
- [7] Nakata S, Yoshida T, Horinaka M, Shiraiishi T, Wakada M, Sakai T. Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells. *Oncogene* 2004;23:6261–71.
- [8] Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:18030–5.
- [9] Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:617–25.
- [10] Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D, et al. The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10833–8.
- [11] Crazzolara R, Jöhner K, Johnstone RW, et al. Histone deacetylase inhibitors potently repress CXCR4 chemokine receptor expression and function in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2002;119:965–9.
- [12] Reddy P, Maeda Y, Hotary K, et al. Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid reduces acute graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia effect. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:3921–6.
- [13] Andrews KT, Walduck A, Kelso MJ, Fairlie DP, Saul A, Parsons PG. Anti-malarial effect of histone deacetylation inhibitors and mammalian tumour cytodifferentiating agents. *Int J Parasitol* 2000;30:761–8.
- [14] Andrews KT, Tran TN, Lucke AJ, et al. Potent antimalarial activity of histone deacetylase inhibitor analogues. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1454–61.
- [15] 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.
- [16] Murray PJ, Kranz M, Ladlow M, et al. The synthesis of cyclic tetrapeptoid analogues of the antiprotozoal natural product apicidin. *Bioorg Med Chem Lett* 2001;1:733–6.
- [17] Ramalho-Pinto FJ, Gazzinelli G, Howells RE, Mota-Santos TA, Figueiredo EA, Pellegrino J. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule in vitro. *Exp Parasitol* 1974;36:360–72.
- [18] Smithers SR, Terry RJ. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology* 1965;55:695–700.
- [19] Yoshino TP, Laursen JR. Production of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts from mother sporocysts maintained in synxenic culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cells. *J Parasitol* 1995;81:714–22.
- [20] Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press; 2001.

- [21] Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979;18:5294–9.
- [22] Webster PJ, Seta KA, Chung SC, Mansour TE. A cDNA encoding an alpha-tubulin from *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 1992;51:169–70.
- [23] Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, editors. Rapid cycle real-time PCR, methods and applications. Heidelberg: Springer Press; 2001. p. 21–34.
- [24] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
- [25] Caby S, Pierce RJ. Quantitative chromatin immunoprecipitation (Q-ChIP) applied to *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 2009;166:77–80.
- [26] Cosseau C, Azzi AH, Smith K, Freitag M, Mitta G, Grunau C. Native chromatin immunoprecipitation (N-ChIP) and ChIP-Seq of *Schistosoma mansoni*: critical experimental parameters. *Mol Biochem Parasitol* 2009;166:70–6.
- [27] Fejes AP, Robertson G, Bilenky M, Varhol R, Bainbridge M, Jones SJ. FindPeaks 3.1: a tool for identifying areas of enrichment from massively parallel short-read sequencing technology. *Bioinformatics* 2008;24:1729–30.
- [28] Stein LD, Mungall C, Shu S, et al. The generic genome browser: a building block for a model organism system database. *Genome Res* 2002;12:1599–610.
- [29] Khan N, Jeffers M, Kumar S, et al. Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem J* 2008;409:581–9.
- [30] Gannt SL, Gattis SG, Fierke CA. Catalytic activity and inhibition of human histone deacetylase 8 is dependent on the identity of the active site metal ion. *Biochemistry* 2006;45:6170–8.
- [31] Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 2001;276:36734–41.
- [32] Azzi A, Cosseau C, Grunau C. *Schistosoma mansoni*: developmental arrest of miracidia treated with histone deacetylase inhibitors. *Exp Parasitol* 2009;121:288–91.
- [33] Dalgard CL, Van Quill KR, O'Brien JM. Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* antitumour activity of histone deacetylase inhibitors for the therapy of retinoblastoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:3113–23.
- [34] Chen J, Ghazawi FM, Bakkar W, Li Q. Valproic acid and butyrate induce apoptosis in human cancer cells through inhibition of gene expression of Akt/protein kinase B. *Mol Cancer* 2006;5:71.
- [35] Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:725–31.
- [36] Kim H-R, Kim E-J, Yang S-H, et al. Trichostatin A induces apoptosis in lung cancer cells via simultaneous activation of the death receptor-mediated and mitochondrial pathway. *Exp Mol Med* 2006;38:616–24.
- [37] Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. *Curr Biol* 2004;14:R546–51.
- [38] Lopez-Rubio JJ, Gontijo AM, Nunes MC, Issar N, Hernandez Rivas R, Scherf A. 5' flanking region of *var* genes nucleate histone modification patterns linked to phenotypic inheritance of virulence traits in malaria parasites. *Mol Microbiol* 2007;66:1296–305.
- [39] Rada-Iglesias A, Enroth S, Ameer A, et al. Butyrate mediates decrease of histone acetylation centered on transcription start sites and down-regulation of associated genes. *Genome Res* 2007;17:708–19.
- [40] Tan J, Zhuang L, Jiang X, Yang KK, Karaturi KM, Yu Q. Apoptosis signal-regulating kinase 1 is a direct target of E2F1 and contributes to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis through positive feedback regulation of E2F1 apoptotic activity. *J Biol Chem* 2006;281:10508–15.
- [41] Gurzov EN, Ortis F, Bakiri L, Wagner EF, Eizirik DL. JunB inhibits ER stress and apoptosis in pancreatic beta cells. *PLoS One* 2008;3(8):e3030.
- [42] Thelen P, Schweyer S, Hemmerlein B, Wuttke W, Seseke F, Ringert RH. Expression changes after histone deacetylase inhibition by valproic acid in LNCaP human prostate cancer cells. *Int J Oncol* 2004;24:25–31.
- [43] Roger E, Grunau C, Pierce RJ, et al. Controlled chaos of antigenic variants in a metazoan parasite (*Schistosoma mansoni*) interacting with its invertebrate host (*Biomphalaria glabrata*). *PLoS Neg Dis* 2008;2(11):e330.



Supplementary Fig. 1. TUNEL labelling of parasites exposed to TSA or staurosporine. (A) Appearance of TUNEL labelling of schistosomula incubated or not for 48 h with TSA.

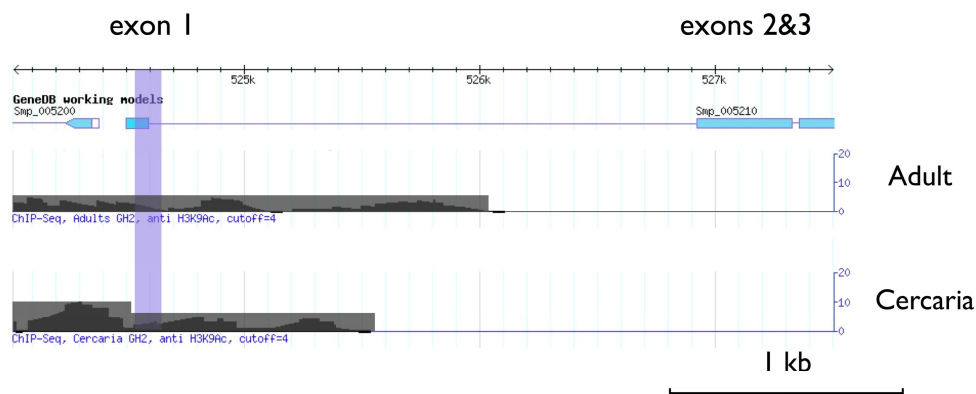
Incubations were as above and larvae were stained using the TUNEL method (see Section 2) and DAPI. Both merged and unmerged images are shown. Positively labelled schistosomula are green. The intensity of labelling, as well as the number of positively labelled larvae, increased with the dose of TSA used. (B) DAPI and TUNEL labelling of schistosomula exposed for 24 h to 5 µM (3, 4) or 50 µM (5, 6) staurosporine or controls (1, 2). At the 50 µM dose of staurosporine, all schistosomula were positively labelled by the TUNEL method.

Smcaspase3	VVSPNRSGKPYRGCILINQRDFEPESTNQSRRDCTDVDARVERVFKSLINYKVTRILNIT	104
Mmcaspase3	LDSSYRMDYPEMGCILINNKNFPEKSTGMSRRSGTDVDAANIRETEMGKIKYQVRNKNDLIT	92
Smcaspase7	SSYVYRFDGMRGCLCVVFSVDNFDPIILCLPPRNGSPVDVQNTIKRAFANLDFRVLIVHSNET	126
Mmcaspase7	PTYIYRMDFCRMLCKCIIINNKNFDKATGMDVRRNGTDEKQAGALEKCFONLGFVTVVHNDCS	115
DmdrICE	HAEENMREKNRGMAIIEENHEHFEVEH~LKSRACTIVDCENLTRVILKQLDFEVTVYKDCR	140
CeCED3	EKTYVYRNPSSERGMGCILINNEHFEEMP~~~TRNCTKADKQNLTNLFRCMGYTVICKDNLIT	270
Smcaspase3	KSVLHQTILEASCAHSSYDSFIEVILSHGDNN~IYANDCEVLTSYIMAFFRGDRCPSSL	163
Mmcaspase3	REDLLELDLDSVSKEDHDKRSFVFCVILSHGDEG~VIYGTNCPVELKRLTSFFRGDNYCRSL	151
Smcaspase7	SESIFSLIRTISTONLRDHDCEACVILSHGDEGCGIYATDGSIPVDRIIAEFRGDIQLDL	186
Mmcaspase7	CAKQDLRKRASEEDHNSACEACVILSHGCEB~LIYCKDGVTEIKDITAHFRGDRCKLIL	174
DmdrICE	YKDLLEFTEIYAAISONHSDSDCILVAIILSHGEG~YIYAKIQYKIDNITWSEFTANHCPSL	199
CeCED3	GRGLLTLTRDEARHEHSHG~DSAILVILSHGRENVIIGVDLIPITSTHEIYDLLNAANAPRL	346
Smcaspase3	IAKPKLFFIQACRGAEDKGVSTMVTDAG~~~~~EDLIV	208
Mmcaspase3	TCKPKLFFIQACRGTELDGGIETDSCGTD~~~~~EEMAC	184
Smcaspase7	RGKPKLFFIQACRGMALDDGVFVCDGPLSN~~~~~SKSADAATTI	226
Mmcaspase7	LEKPKLFFIQACRGTELDGCIQADSCPIN~~~~~DIDANPR	210
DmdrICE	AKPKLFFIQACGDRIDGGVTMQRSTET~~~~~DGSSMS	236
CeCED3	ANKPKLFFIQACRGERRDNGFPVLDLSDGVPAFLRRGWDNRDGPLFNFELGCVRPQVQQVW	406
Smcaspase3	HKIPVEADFLIAYSTVPGFAWRNSSSGSWFICELCAAFESDMKNANHSDIMSLLTAVAR	257
Mmcaspase3	QKIPVEADFLIAYSTAPGYYSWRNSKDGSWFICSLCSMK~~~LYAHKLEFMEILTRVNR	241
Smcaspase7	RRIPVEADFLIAYAVCPGYAERNVNGSWFIALSDVLL~~~RYGNLIDLLSILTRVNY	283
Mmcaspase7	NKIPVEADFLIAYSTVPGYYSWRNPGKGSWFVQALCSIN~~~EFGKLEIDILTRVND	267
DmdrICE	YKIPVEADFLIAYSTVPGYYSWRNTRGSWFVQALCAEFA~~~ANGKRLIDILTLTEVCO	293
CeCED3	RKRPSQADFLIAYATTACIYVSWRNSARGSWFIOAVCEVFS~~~TBAKMDVVELLDEVNK	465
Smcaspase3	VVAIYQYRSNT~GQIETDNMKQMTSTVSTLTRLLEYIN	292
Mmcaspase3	KVAREHFESES~LDSTFEAKKQIIPGIVSMLTKELYFY	276
Smcaspase7	DVAREHFESETA~ANPSECGKKOMPSEVSTLTKELVIFP	318
Mmcaspase7	RVAREHFESES~DDPRFNEKKQIIPGVMSMLTKELYFS	302
DmdrICE	RVAVDFESCAPDTPEMHCKKQIIPGIVMLTRLRIFS	329
CeCED3	KVACCFEFTSQ~~~GSNILKQMPMTSRLLKPEYFWE	496

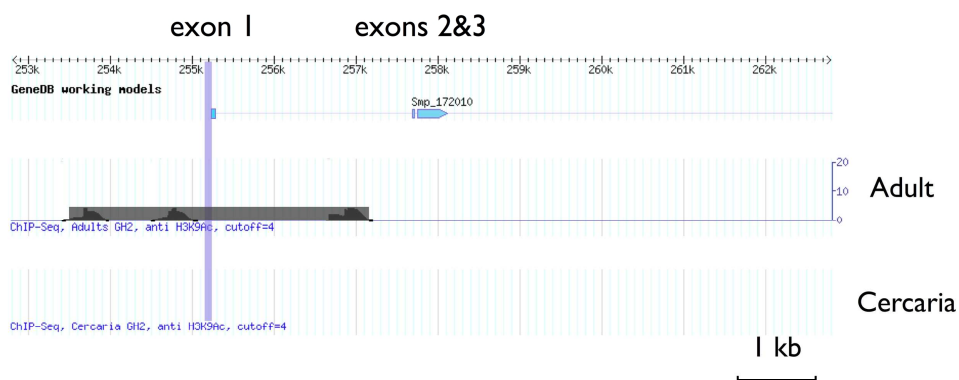
Supplementary Fig. 2. Alignment of the catalytic domains of *S. mansoni* caspases 3 (Smcaspase3; accession number FJ905905) and 7 (Smcaspase7; FJ905906) with orthologues from other species.

Sequence alignments with mouse caspase 3 (Mmcaspase3; NP_033940) mouse caspase 7 (Mmcaspase7; NP_031637) *Drosophila melanogaster* drICE (DmdrICE; CAA72937) and *Caenorhabditis elegans* CED3 (CeCED3; P42573) were done using the MegAlign programme (DNASTar Inc.) and the BioEdit v7.0.1 package (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

(A) SmHDAC1 (Smp_005210)



(B) Smcaspase7 (Smp_172010)



Supplementary Fig. 3. Schematic representation of exon location (top) and H3K9 acetylation (bottom) for SmHDAC1 (A) and Smcaspase7 (B).

The H3K9 acetylation profiles were generated by ChIP-Seq, x-axis is in kilo-basepairs (kb), y-axis in arbitrary acetylation units. After immunoprecipitation with an antibody against acetylated H3K9, DNA was sequenced and unique sequences were mapped to the genome. Profiles were generated by an automatic peak-finding algorithm (findpeaks v 3.1). Dispersed repeats are excluded from this analysis since their genomic origin cannot be determined. The peak-finding algorithm also produces some artifacts. Therefore, the profiles were compared to profiles generated with input DNA alone (before ChIP). In the profiles, full black zones correspond to automatic peak finding, superposed grey zones were reconstructed and corrected for presence of repeats and peak-finding artifacts by visual inspection. The light purple zone corresponds to regions where presence of acetylated H4 was determined by ChIP and qPCR.

Supplementary Table 1: Oligonucleotide primers used in the study

Gene	Primer Use	Sequence (5'-3')
SmHDAC1	Quantitative Rt-PCR forward	<u>gCgAgTATTTTCCCggAACTg</u>
	Quantitative Rt-PCR reverse	<u>CgCgACCTgCACCAATATCT</u>
	Q-ChIP forward	TCAgCAACTAACAAAAgTCTgC
	Q-ChIP reverse	CAAAggACCCAAATACATAACTTCAC
SmHDAC3	Quantitative Rt-PCR forward	TTTTACgATCCAgATTgTgggA
	Quantitative Rt-PCR reverse	CATgggATgATTCggTCCATA
Smcaspase3	5' RACE PCR primer	AgTTATCCAgTAgTTAgTCCCAATCgTTCT
	5' RACE PCR nested primer	TTTTTCgTggTgATCggTgTCCT
	3' RACE PCR primer	TgAAgAggAgTTACgCCAAgCAAAAA
	3' RACE PCR nested primer	AAATCTTCACCTgCATCTgTTACCATAgT
	Quantitative Rt-PCR forward	TTTgCggTCAATgAAgAAATAAAC
	Quantitative Rt-PCR reverse	AAgAgCgAAACACAATCgTgC
Smcaspase7	5' RACE PCR primer	ATTCgTCTTATTgTTgTCgCAGCATCC
	5' RACE PCR nested primer	TgCgTATATCAATCCACCCTCATCAC
	3' RACE PCR primer	AgggATTAgCTgCAGTgACTCgTATTC
	3' RACE PCR nested primer	TAAgCCCgTATgAACCAAgAACC
	Quantitative Rt-PCR forward	CgTgACCATgATTgTTTCgC
	Quantitative Rt-PCR reverse	gCAATgATACgATCCACggg
	Q-ChIP forward	TggAAAATggTTTTAATAATTcAgAgA
	Q-ChIP reverse	gACCgATTcAgACAgCAATg
α -tubulin	Quantitative Rt-PCR forward	AgCAGTTAAgCgTTgCAGAAATCA
	Quantitative Rt-PCR reverse	TgACgAgggTCACATTTCCACAT

^a Restriction enzyme sites are in bold, start or stop codons are underlined.

Supplementary Table 2 : *Smcaspase7* gene organization¹

Contig	Exon sequence limits	Exon size	Intron size	cDNA sequence limits	Coding sequence	Peptide sequence
Smp_contig025678 ²	24075-24119	45		1-45	-	
	26494-26540	47	2375	46-92	63-92	1-9
	26573-26952	380	33	93-472	93-472	10-136
Smp_contig025681 ³	1-168			304-472		
	877-1056	179	709	473-651	473-651	137-196
Smp_contig025682	1539-1680	142	>1889	652-793	652-793	197-243
Smp_contig025683	4616-5196	581	>4987	794-1374	794-1050	244-329

¹ Data from *S. mansoni* genome assembly version 3.1 (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_mansoni).

² Smp_contig025678 (23880-26855) is identical to Smp_contig025680 (1-2976) but the rest of the sequences diverge, truncating exon 3 in Smp_contig025680.

³ Smp_contig025678 and Smp_contig025681 are contiguous. Smp_contig025681 and Smp_contig025680 align only in exon 3.

Supplementary Table 3 : *SmHDAC1* gene organization¹

Contig	Exon sequence limits	Exon size	Intron size	cDNA sequence limits	Coding sequence	Peptide sequence
Smp_contig001596	7618-7713	96		1-96	54-96	1-14
	9952-10454	503	2239	97-599	97-599	15-182
	10487-10675	189	33	600-788	600-788	183-245
	10709-10865	157	34	789-945	789-945	246-297
	11170-11418	249	305	946-1194	946-1194	298-380
	14431-14747	317	3013	1195-1511	1195-1511	381-486
	15552-15801	250	805	1512-1761	1512-1604	487-517

¹ Data from *S. mansoni* genome assembly version 3.1 (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_mansoni).

Discussion

Nos travaux sur les histones désacétylases de classe I du parasite *S. mansoni* ont permis de montrer une conservation relative de ces enzymes. Trois membres de cette famille ont été mis en évidence alors que quatre sont généralement retrouvés chez les mammifères. SmHDAC1 et 3 sont fortement conservées. L'absence d'une HDAC2, résultant d'une duplication de HDAC1 chez les vertébrés [Gregoretto et al, 2004], n'a rien de surprenant lorsqu'on considère la présence d'un unique membre de la sous-famille HDAC1/2 chez *D. melanogaster* [Gregoretto et al, 2004]. En revanche, ceci peut être plus surprenant puisqu'il est connu que de nombreuses duplications de gènes sont retrouvées chez les schistosomes, par exemple SmCBP1 et SmCBP2 [Bertin et al, 2006].

Le criblage des banques de données a, par ailleurs, permis de mettre en évidence la présence de HDACs de classe II chez *S. mansoni*. En effet, chez les mammifères six membres composent cette famille, HDAC4, 5, 6, 7, 9 et 10 [Gregoretto et al, 2004]. Chez le parasite, SmHDAC4 et 5 ont été identifiées et nous avons également procédé au clonage de leurs ADNc complets (résultats non-montrés). Deux orthologues de HDACs proches de HDAC6/10 ont été retrouvés, l'obtention des ADNc est en cours. En revanche, aucun orthologue de HDAC7 et 9 n'a été identifié dans les banques de données chez *S. mansoni*, il en est de même pour HDAC11 de classe IV qui est considérée comme spécifique des mammifères.

Concernant l'inhibition des HDACs avec les différentes drogues, notre étude ne nous permet pas de discriminer de rôle précis pour chacune de ces enzymes puisque les inhibiteurs utilisés ne sont pas spécifiques d'une enzyme mais répriment plusieurs classes de HDACs. De plus les activités mesurées englobent l'activité désacétylase des quatre classes de HDACs, or notre intérêt se porte sur la classe I. Afin de nous focaliser davantage, il serait envisageable de réaliser des expériences similaires en intégrant des inhibiteurs spécifiques des différentes classes, tels que l'acide azélaïque pour la classe IIb [Mottet & Castronovo, 2008]. Cependant le meilleur moyen de déterminer le rôle de chaque HDAC serait d'effectuer de l'ARN interférence sur les différentes enzymes, en supposant que la redondance fonctionnelle des différentes protéines ne soit pas un frein et qu'il n'y ait pas de complémentarité.

Les concentrations de trichostatine A utilisées dans nos expériences sont plus élevées que les concentrations habituellement utilisées sur des cellules [Bolden et al, 2006]. Comme nous savons qu'à 10 μ M de TSA dans le milieu de culture la mort parasitaire intervient rapidement et qu'à 2 μ M l'apoptose semble se mettre en place (article 2 et Figure

supplémentaire 1), il pourrait être intéressant de réitérer les expériences avec des concentrations de drogues plus faibles, de l'ordre du nanomolaire, sur des cultures parasitaires plus longues dans le temps afin de déterminer si cela aboutirait également à la mort des parasites.

Par ailleurs, les HDACs sont des cibles prometteuses concernant la recherche contre le cancer avec l'élaboration et le développement d'inhibiteurs spécifiques [Bolden et al, 2006]. En effet de nombreux inhibiteurs de HDACs ont prouvé leurs effets anti-tumoraux. De plus les HDACs sont également des cibles potentielles anti-apicomplexa [Andrews et al, 2000 ; Strobl et al, 2007]. Pourquoi ne pas les envisager comme cibles anti-schistosomes? Dans un premier temps il est important d'identifier une enzyme suffisamment spécifique du parasite afin d'en faire une cible potentielle. Pour cela, SmHDAC1 et 3 sont très fortement conservées. En revanche, SmHDAC8 est la plus particulière des enzymes caractérisées. La mise en évidence de SmHDAC8 est originale puisque cette protéine était jusqu'alors considérée comme spécifique des vertébrés. A la vue de l'expression élevée du gène à travers tous les stades de vie, SmHDAC8 pourrait être extrêmement importante chez le parasite. Toutes ces données ainsi que la présence de plusieurs insertions à travers le domaine catalytique de cette protéine lui confère un intérêt particulier, notamment pour le développement de molécules régulatrices spécifiques de SmHDAC8. C'est pourquoi une analyse fonctionnelle approfondie de cette enzyme permettrait éventuellement de mettre à jour des fonctionnalités originales et intéressantes. De plus comme c'est la seule HDAC de classe I qui ne nécessite pas d'interactions avec d'autres protéines pour être active, son étude biochimique, sous forme native ou recombinante, présage d'être simplifiée par rapport aux autres HDACs de classe I dont leur implication dans un complexe protéique est essentielle pour leur activité désacétylase [de Ruijter et al, 2003]. La modélisation de la structure de SmHDAC8 montre que certains résidus au niveau du site catalytique sont différents, ce qui semblerait être prometteur pour le développement d'inhibiteurs spécifiques (Article 1 ; Figure supplémentaire 1).

La variation dans le niveau d'acétylation de l'histone H4 consécutive aux traitements semblerait être due aux HDACs de classe I étant donné leur localisation. En effet les HDACs de classe II sont principalement cytoplasmiques et celles de classe I nucléaires. Bien qu'un trafic soit possible, la localisation principale des HDACs de classe I est plus cohérente pour la désacétylation des histones, également nucléaires. L'obtention d'anticorps contre chaque SmHDAC permettrait de réaliser l'immunolocalisation nécessaire pour obtenir ces informations supplémentaires.

Nos travaux sur l'acétylation des histones, ainsi que ceux de Cosseau et al [2009] et de Caby & Pierce [2009] jettent les bases de l'étude des modifications épigénétiques chez les schistosomes. L'application des techniques de CHIP, de Q-CHIP et de CHIP-Seq, pour la première fois chez un parasite métazoaire, ont permis de démontrer le rôle central de l'acétylation des histones au niveau des promoteurs de gènes sur la transcription. L'augmentation de l'acétylation au niveau, notamment, du promoteur proximal du gène codant Caspase 7 après traitement des parasites par la TSA, est corrélée avec l'accroissement de la quantité du transcrit correspondant. De plus, l'étude par CHIP-Seq (effectuée par C. Grunau et C. Cosseau de l'UMR CNRS 5244, Université de Perpignan) a permis de corréliser les résultats de Q-CHIP concernant le degré d'acétylation de l'histone H4 au niveau des promoteurs de parasites non-traités, avec le niveau d'acétylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9). Ces résultats tendent à suggérer que le degré global d'acétylation de ces promoteurs serait en relation avec leur niveau de transcription. Toutefois, des études complémentaires sur le niveau d'acétylation de résidus spécifiques de l'histone H4 (H4K16 notamment) et sur la méthylation d'autres résidus chez les histones H3 et H4, ainsi que des études sur le génome entier, sont nécessaires afin de dresser un tableau complet du rôle des modifications épigénétiques dans l'expression de gènes de *S. mansoni*. L'un des intérêts principaux de ce genre d'étude serait de déterminer le rôle de ces modifications dans le contrôle de l'expression de gènes spécifiques de stades parasitaires, tels que la famille de gènes *SmPoMuc*, qui codent pour des protéines *mucine-like* et qui sont exprimés uniquement aux stades interagissant avec l'hôte intermédiaire, le mollusque *B. glabrata* [Roger et al, 2008]. En effet, l'élucidation des mécanismes impliqués dans un tel degré de contrôle de la transcription jetterait de la lumière sur les adaptations du schistosome à son mode de vie parasitaire.

LA HDAC DE CLASSE III SmSIRT1 ET LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION SmFoxO : INTERACTION FONCTIONNELLE CHEZ *SCHISTOSOMA MANSONI*.

Présentation

Les HDACs sont des enzymes extrêmement conservées dans le règne du vivant. Suite à la caractérisation de la classe I de HDACs du parasite *S. mansoni*, nous avons décidé de nous focaliser sur une enzyme de la classe des sirtuines, Sirt1.

La classe III des HDACs regroupe les enzymes NAD⁺-dépendantes et non Zn²⁺-dépendantes et est constituée des homologues de Sir2 de levure. Chez l'Homme, 7 membres constituent cette famille de protéines, Sirt1 à 7. Par ailleurs, grâce à un criblage dans les banques de données, 5 sirtuines ont pu être identifiées chez *S. mansoni* (R. Pierce, résultats non-publiés). A l'instar des autres classes de HDACs, les sirtuines sont des cibles thérapeutiques potentielles et des inhibiteurs de sirtuines ont été testés dans différentes pathologies, notamment contre des parasites protozoaires. Par exemple, chez *P. falciparum*, PfSir2 est sensible au nicotinamide, mais pas à d'autres inhibiteurs tels que le sirtinol ou la splitomicine [Merrick & Duraisingh, 2007]. Le nicotinamide et la surfactine répriment la croissance intra-érythrocytaire des parasites [Prusty et al, 2008 ; Chakrabarty et al, 2008]. De plus, chez *Leishmania infantum*, le sirtinol induit un arrêt de la croissance parasitaire *in vivo*, et l'induction de l'apoptose [Vergnes et al, 2005].

Dans notre modèle d'étude, Sirt1 a retenu notre intérêt pour son interaction avec le facteur de transcription FoxO et leur implication dans la régulation de la longévité en réponse aux disponibilités caloriques. En effet, chez les organismes modèles, tels que la souris, *C. elegans*, *S. cerevisiae*,... il a été démontré à plusieurs reprises qu'une restriction calorique entraîne une augmentation de la durée de vie et une baisse de la fécondité [Bordone & Guarente, 2005 ; Tissenbaum & Guarente, 2002]. C'est pourquoi trois particularités des schistosomes ont retenu notre attention et nous semblent donc en contradiction avec ces faits reconnus.

Les vers adultes schistosomes ont une durée de vie extrêmement longue au sein de leur hôte définitif l'Homme, puisque des cas de patients infectés par le parasite ont révélé que l'infection datait de plus de trente ans [Chabasse et al, 1985]. Par ailleurs, les femelles ont une capacité de ponte très élevée car elles libèrent chaque jour jusqu'à 300 œufs pour *S. mansoni*. De plus, les parasites adultes migrent au niveau des veines mésentériques chez l'Homme où la concentration en glucose est élevée, des études ont montré qu'ils ont la capacité de consommer jusqu'à cinq fois leur poids sec en glucose toutes les cinq heures

[Bueding, 1950]. L'ensemble de ces caractéristiques nous ont amené à étudier un rôle potentiel de SmSirt1 et de SmFoxO dans la régulation de la longévité.

Chez les organismes modèles, la voie de signalisation de l'insuline est centrale dans les mécanismes régulant la durée de vie. Il a été démontré que l'interaction entre les deux protéines Sirt1 et FoxO est cruciale pour la régulation de cette voie [Morris, 2005 ; Nemoto et al, 2004].

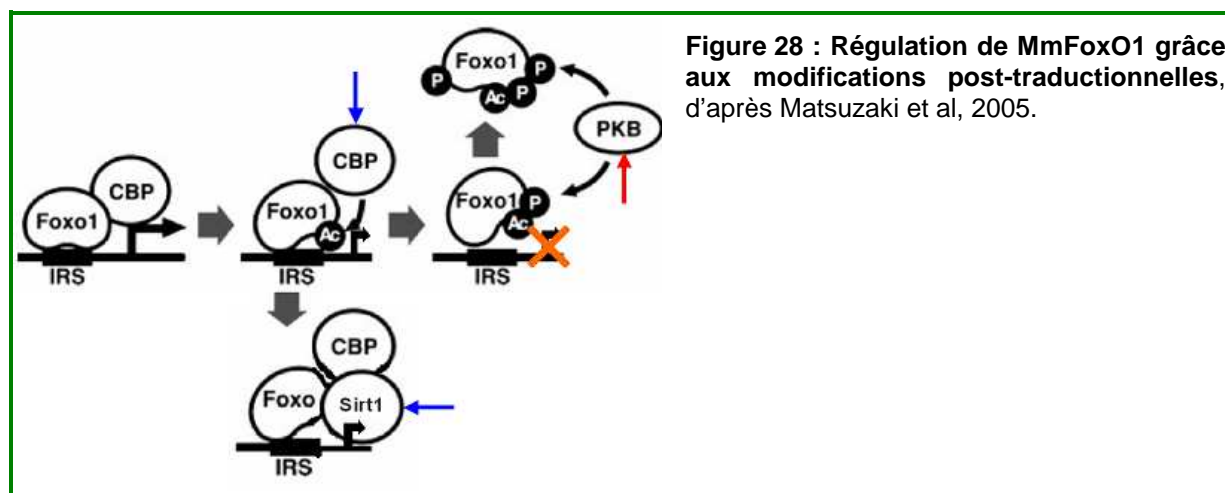
FoxO appartient à une famille de facteurs de transcription, définie par le domaine de liaison à l'ADN d'environ 100 résidus et qui est conservé parmi tous les membres de la famille [Hannenhalli & Kaestner, 2009]. Ce domaine, nommé *forkhead box (FKH)*, est composé de 3 hélices- α , 3 feuillets- β et deux régions « ailes » flanquant le troisième feuillet β . A cause de la structure en aile de papillon de ce domaine FKH est également nommé « hélice ailée » (*winged helix*). La plupart des protéines Fox se lient à l'ADN en tant que monomères par la troisième hélice, des résidus flanquants et par les deux ailes. Les membres de la famille montrent très peu de similarité en dehors du domaine FKH et ont des rôles très diversifiés. Toutefois la duplication de certains gènes *Fox* a généré des paralogues avec des fonctions chevauchantes et, jusqu'à un certain point, redondantes. Chez les mammifères il y a 4 représentants de la famille FoxO (FoxO1, 3, 4 et 6) tous impliqués dans la signalisation dépendante de l'insuline, le diabète et la longévité.

FoxO est, entre autre, régulé par la voie de signalisation dépendante du récepteur à l'insuline et à l'*Insulin Growth Factor* (IGF), et Sirt1, en désacétylant FoxO permet de le maintenir au niveau des éléments de réponses des promoteurs de ses gènes cibles. En effet, FoxO est exprimé de façon pléiotropique dans les tissus et sa capacité de régulation de la transcription des gènes cibles est fortement régulée par des modifications post-traductionnelles. Celles-ci peuvent être la phosphorylation et la balance acétylation/désacétylation en réponse aux variations du milieu extérieur (chaleur, stress oxydatif, disponibilité en nutriments) [Greer & Brunet, 2005].

L'enzyme CBP/p300 (cAMP-response-element Binding Protein/p300), en plus de son activité histone acétyltransférase (HAT), peut également acétyler FoxO. Bien que certains résultats semblent montrer un effet stimulateur de l'acétylation sur l'activité transcriptionnelle de FoxO et que la liaison entre CBP/p300 et FoxO soit nécessaire pour cette activité [van der Heide & Smidt, 2005], il semble maintenant établi que l'acétylation de FoxO par CBP/p300 entraîne le détachement partiel de FoxO de son élément de réponse (**Figure 28**). Dans ce cas, FoxO peut alors être désacétylé par Sir2/Sirt1, restaurant son activité. En revanche, lorsque l'insuline/IGF-1 se fixe sur son récepteur et active la voie de signalisation impliquant la PI3K et FoxO, ce dernier est phosphorylé par la PKB/Akt. Cette modification entraîne le détachement du facteur de transcription de son élément de réponse et son

exclusion du noyau [Matsuzaki et al, 2005]. FoxO est alors pris en charge par la protéine 14-3-3 afin d'être ubiquitinilé et dégradé par le protéasome.

A l'inverse, lorsque la voie de signalisation dépendante de l'insuline n'est pas activée, FoxO acétylé peut être désacétylé par Sir2/Sirt1. Cette désacétylation est nécessaire et suffisante pour permettre à FoxO d'exercer son activité transcriptionnelle [Daitoku et al, 2004].



Comme il a été mis en évidence la présence de deux récepteurs à l'insuline chez le schistosome [Khayath et al, 2007], ceci nous a amené à identifier et à étudier la conservation ou non de cette voie de signalisation chez le schistosome.

A cours de mes travaux de thèse, nous avons mis en évidence l'existence d'un orthologue pour SmSirt1 mais également pour SmFoxO, et la conservation relative de ces deux protéines. Nous nous sommes intéressés à l'expression de leurs ARN messagers au cours du cycle parasitaire. La caractérisation fonctionnelle de SmFoxO a permis de mettre en évidence sa capacité d'activer la transcription. Finalement, nous montrons sa fixation au niveau de différents promoteurs de potentiels gènes cibles, ainsi que celle de SmSirt1.

Functional interaction of Sirtuin 1 and FoxO from *Schistosoma mansoni*

Florence Dubois, Stéphanie Caby, Frédéric Oger¹, Christophe Noël², Monique Capron, Colette Dissous and Raymond J. Pierce*

Inserm, U 547, Lille, France; Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France; Institut Pasteur de Lille, IFR 142, 1 rue du Professeur A. Calmette, 59019 – Lille, France.

¹Present address: UMR CNRS 6026, Equipe SPARTE, Université de Rennes 1, IFR 140 GFAS, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex, France.

²Present address :

* Corresponding author: Raymond J. Pierce, Inserm U 547, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professor A. Calmette, 59019 – Lille, France.

Tel: +33 320877783

Fax: +33 320877888

e-mail: Raymond.Pierce@pasteur-lille.fr

Keywords: *Schistosoma mansoni*, Sirtuin, Forkhead Box, transcription, chromatin immunoprecipitation (ChIP).

Abstract

Schistosoma mansoni is a platyhelminth parasite characterized by extreme longevity within its human host combined with remarkable fecundity. In most other organisms there is a trade-off between lifespan and fertility and the former is governed in part by availability of energy, dietary restriction leading to a longer lifespan. The insulin receptor-dependent signalling pathway is central to this mechanism; stimulation of the insulin receptor and downstream PI3K/PKB signalling pathway reduce lifespan and their inhibition increases it. The transcription factor FoxO is a target of this pathway and is additionally regulated by the class III histone deacetylase Sirt1. As an initial step towards the elucidation of the apparent uncoupling of longevity and fecundity in schistosomes, we have cloned and characterized orthologues of both Sirt1 and FoxO from *S. mansoni*. Both are encoded by single-copy genes and SmSirt1 is characterized by a large insertion in the catalytic domain. Although transcripts of SmSirt1 and SmFoxO are differentially expressed in the various *S. mansoni* life-cycle stages, the expressed proteins interact positively to drive transcription in transfected mammalian cell lines. Moreover, both SmFoxO and SmSirt1 are bound *in vivo* to FoxO response elements in the promoter regions of target genes, indicating that they interact functionally in schistosomes.

Introduction

Schistosomes are platyhelminth parasites that infect 200 million people and cause about 200,000 deaths annually [1]. Schistosomiasis therefore remains a major health problem, particularly in sub-Saharan Africa and although the only available drug, praziquantel, is effective and safe, concerns about the development of resistance, particularly by *Schistosoma mansoni* [2], mean that new drugs are needed to treat and control this disease. In the search for novel therapeutic targets, we decided to focus on one of the most striking characteristics of *S. mansoni*, its extreme longevity. Adult worms are able to live for more than 30 years within their definitive human host [3]. At the same time their calorie intake is very high as they consume up to 5 times their dry weight in glucose every 5 hours [4]. Finally, *S. mansoni* female worms lay about 300 eggs every day. In other organisms such as yeast, the mouse, the fruit fly, *Caenorhabditis elegans* or humans, dietary restriction extends lifespan and concomitantly reduces fertility [5, 6]. *S. mansoni* therefore represents a paradox since although adult worms never experience dietary restriction and have high reproductive fertility, they nevertheless have a long lifespan.

Dietary restriction (DR) regulates lifespan via the insulin/IGF receptor signalling pathway in *C. elegans*, *Drosophila* and mammals [7 for review] that culminates with the Forkhead box “Other” (FoxO) transcription factors. Activation of this pathway under conditions of unrestricted access to food leads to phosphorylation of FoxO by PKB/Akt and its inactivation via exclusion from the nucleus. Under conditions of DR FoxO is located in the nucleus and activates the transcription of genes involved in longevity (stress resistance genes), metabolism (gluconeogenesis and food intake), development and differentiation and tumour suppression (apoptosis). It is now clear that this wide variety of functions is regulated, not only by phosphorylation, but by a complex interplay between post-translational modifications of FoxO (acetylation, mono- and polyubiquitylation) and protein partners. It has been suggested that FoxO post-translational modifications form a “FoxO code” that is read by the partners and specifies the level and activity of FoxO transcription factors within cells [8].

Sirtuin 1 (Sirt1) is a class III histone deacetylase with multiple functions and is a crucial link between cellular metabolism and longevity [9 for review]. It is a major partner that determines the transcriptional activity of FoxO by maintaining it in a deacetylated state that prevents its phosphorylation and consequent exclusion from the nucleus [10]. In fact acetylation of FoxO by CBP/p300 partially inhibits its binding to its response element, facilitating its phosphorylation by PKB/Akt, subsequent binding to the (phospho-Ser/Thr binding) 14-3-3 protein and export from the nucleus [10]. The way in which the activity of Sirt1 is itself regulated in response to dietary restriction has recently been explained [11].

Sirt1 activity is activated by increasing cellular NAD⁺ levels that are controlled under conditions of DR by AMP-activated protein kinase (AMPK) that acts as a sensor for changes in the intracellular AMP/ATP ratio.

In order to determine whether FoxO and Sirt1 are involved in the control of longevity in schistosomes in a similar way to other metazoan organisms, and whether the transcriptional activity of schistosome FoxO is regulated by the insulin receptor-dependent signalling pathway, it was first necessary to characterize FoxO and Sirt1 and their functional interaction in *S. mansoni*. Here we show that FoxO and Sirt1 are present in the parasite. SmSirt1 has a large insertion in the catalytic domain but, like mammalian Sirt1, it is capable of enhancing the transcriptional activity of both mouse FoxO3a and SmFoxO. Moreover, both SmFoxO and SmSirt1 were present on promoters of FoxO target genes in *S. mansoni* adult worms and infective larvae.

Materials and Methods

Parasites.

A Puerto-Rican strain of *S. mansoni* was maintained in *Biomphalaria glabrata* snails and golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). Cercariae were released from infected snails and harvested on ice. Schistosomula were obtained *in vitro* [12]. Adult worms were obtained by whole-body perfusion of 6-week infected hamsters [13] and male and female worms separated manually. Eggs were obtained from the livers of infected hamsters and hatched out under light to obtain miracidia [14]. Primary sporocysts were obtained after overnight axenic culture of miracidia as described [14]. Parasite DNA was extracted from the free-living cercariae using standard methods [15]. Total RNA was extracted from all life-cycle stages using the guanidine thiocyanate/caesium chloride method [16].

Molecular cloning of *S. mansoni* Sirt1 and FoxO.

S. mansoni EST sequences encoding peptides with significant identity to class III HDACs and FoxO were detected by tblastn screening of the EST database (http://compbio.dfc.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gireport.pl?gudb=s_mansoni) using the human SIRT1 (AAH12499) and *C. elegans* DAF-16 (AAC47803) peptide sequences as probes. These sequences were used to screen the genomic sequence assembly 3 at the Wellcome Trust Sanger Institute (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_mansoni). Sequence alignments and analysis were carried out using the DNASTar Lasergene programme package. Complete cDNA sequences of *S. mansoni* Sirt1 and FoxO were obtained by 5' and 3' RACE amplification (SMART RACE cDNA Amplification kit, Clontech) according to the manufacturer's instructions. All oligonucleotide primers used in this study are listed in Table1. Fragments encompassing the complete coding sequence of Sirt1 and FoxO were obtained by PCR on adult worm cDNA, cloned and sequenced as previously described [17].

Phylogenetic analysis.

Accession numbers of the sequences included in the data set are listed in the legends to Figs 1C and 2B. Amino acid sequences were aligned with the use of the BioEdit v7.0.1 package (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) and phylogenetic inference was restricted to sites that could be unambiguously aligned. (236 shared sites, corresponding to the catalytic domain, were analysed for sirtuins and 104 shared sites, corresponding to the forkhead box, for the FoxO transcription factors). Phylogenetic analysis of the data set was carried out using two different methods. Bayesian analysis (MrBAYES v3.1.2 [18]) was performed as previously described [19]. A second analysis of the same data

was carried out using PhyML [20] using the same model. Bootstrap analysis was done on 500 repetitions.

Quantitative RT-PCR.

Reverse transcription of total RNA from *S. mansoni* life-cycle stages and real-time quantitative PCR were carried out exactly as previously described [21]. Primers (Table 1) were designed by the Primer Express Program (Applied Biosystems) and used for amplification in triplicate assays. Determination of PCR efficiency and calculations of the relative expression were also as previously [21] according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [22].

Immunolocalisation / Immunocytochemical procedures.

Rabbit antisera to SmFoxO and SmSirt1 were generated against non-conserved peptides derived from the primary sequences by Proteogenix SA (peptides sequences for SmFoxO : ANEHKDVSSLSTIRSYDQA and DDDCEPLELELSLELADR, and peptides sequences for SmSirt1 : ELVNDESQRNDNSEVNEK and SSSDNSELNMKNSSNDA). Cercariae, schistosomula and adult worm pellets were fixed in PBS pH7.4 containing 4% paraformaldehyde during 1h at 4°C. After fixation, parasites were centrifuged (1min, 800xg) on poly-L-lysine coated slides (Cyto-Tek centrifuge) and immersed in a permeabilizing PBS solution containing 0.5% Triton X-100 during 30 min. A saturation step was performed in PBS buffer containing 1% Bovine Serum Albumin (BSA), 1% normal goat serum (NGS, Sigma) and 0.1% NaN₃ (Sigma) during 1h at room temperature. Parasites were then successively incubated with the anti-SmFOXO or anti-SmSIRT1 antibody for 1h30min at room temperature and with Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (BioSys, France) diluted 1/4000 in PBS buffer containing 1% BSA, 1% NGS and 0.1% NaN₃ for 1h at room temperature. Slides were mounted in glycerine buffer and examined by epifluorescence using a Zeiss axioscope 2 microscope (Carl Zeiss AG) and a Leica DC350FX camera (Leica) [23]. Controls were carried out with anti-SmFOXO or anti-SmSIRT1 antibody preabsorbed overnight at 4°C with pure peptides.

Plasmid Constructions, Cell Culture and Transfection.

The 3xIRS-MLP-Luc reporter plasmid containing 3 copies of the IGF1P1 promoter response sequence (IRS) and a copy of the luciferase gene was used as reporter vector. In the case of the SmSIRT1-V5 construct, the coding sequence was cloned into the *Bam* HI-*Not* I restriction sites of the pcDNA 3.1/V5-His C vector (Invitrogen) in frame with the C-terminal V5 tag. SmFoxO was cloned into the N-Terminal p3XFLAG-CMV-10 vector (Sigma) with the *Not*I-*Bam*HI restriction sites and mouse FoxO1, which was used as a positive control, was cloned

into the pcDNA3-FLAG vector into the *Bam*HI restriction sites and was a kind gift from A. Fukamizu [24]. Co-transfection assays using HEK-293T cells were performed as previously described [21].

Site-directed mutagenesis.

The SmSIRT1 catalytic mutant was generated by modifying an Asn residue (N247A) in the catalytic domain using the QuikChange[®] Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene[™]), according to the manufacturer's instructions using oligonucleotides shown in Table 1. Following sequence verification, positive clones were used directly in transfection assays.

Quantitative chromatin Immunoprecipitation (ChIP).

The method used for Q-ChIP was recently described in detail [25]. Briefly, parasites were fixed in 1% formaldehyde and sonicated to fragment the chromatin. Immunoprecipitation was carried out using rabbit anti-FoxO or Sirt1 sera or chicken anti-Sirt1 serum, with non-immunised rabbit serum or chicken serum as controls. Q-PCR was carried out on immunoprecipitated DNA or input using oligonucleotide primers shown in Table 1 and results expressed as the percentage of the input immunoprecipitated by anti-FoxO or anti-Sirt1 sera.

Table 1. Oligonucleotides used in the study

Gene	Oligonucleotide name	Sequence (5'→3')	
SmSirt1	SmSirt15'1	CTCACAATCgCTTTCggCAgACTCg	
	SmSirt15'NP	TCgTCATTATTAgTgTTATTATCATCTCA	
	SmSirt13'1	TgTACAAGTggCTgATgCAAATgAAC	
	SmSirt13'NP	TTTCgATTAACTTTTggAgATgTAT	
	SmSirt1FLBamHIF	CAATCgCgCTTTATCCAgg ATCC ATggACAC	
	SmSirt1FLNotIR	gATAAACTACTAg CggCCgCAC gTggTAAACTTg	
	SmSirt1qPCRf	gTCCACAggCAATgTTTgACA	
	SmSirt1qPCRr	AATCgAAggTgAAAAGTgACCAg	
	SmSirt1insertF	gTTCATTTgCATCAgCCACTTg	
	SmSirt1insertR	TAACgATgACCCAATAACTAAAATA	
	SmSirt1N247AF	GCgCAACTACACCAAgg CC ATCgACACCCTgg	
	SmSirt1N247AR	CCAgggTgTCgAT ggCC TgggTgTAgTTgCgC	
	SmFOXO	SmFOXOGSP5'1	CCTgTACCTCTgTTgACAgATCACC
		SmFOXOGSP5'2	ggCAgCAgCAgCTCAATCTCATTgg
SmFOXOGSP3'5		CTgTTCgCATTCTCATgACCACTATTTCC	
SmFOXOGSP3'6		CACgCCAAgAACCGgAAgATgAACCGACAg	
SmFOXOFLBamHIR		ggTACTgATAC ggATCC ggTCCgATgAg	
SmFOXOFLNotIF		CTCAACTATT CgCggCCgCC ATgTCCgC	
SmFOXOqPCRf		AAgCAgTgCgTCggAAgTTC	
SmFOXOqPCRr		gCACgCggACgTAATAgTgAA	
SmIR1		SmIR1p1F	AgggTTATgTgggTAgggCTCAAT
	SmIR1p1R	CAGACTAgAACgCACATAATggAAACAA	
	SmIR1p2F	AgCTCTTCTgTATTCgTTTTT	
	SmIR1p2R	CTTTTTgTTgCTTCAgTCTTA	

	SmIR1p2qF	TgATCCCTgCTgTTTTCAgAAA
	SmIR1p2qR	ACAgtCATTACATATCgggCgA
SmIR2	SmIR2p1F	ATCAAgtCAAACATAAAAgtAgC
	SmIR2p1R	ATAACTAAACTggggTgACATAA
	SmIR2p1qF	GgTTCAgACCgtCTAAATTTggAA
	SmIR2p1qR	TCCTTTgAACAATCCAAGTgATgT
SmPEPCK	SmPEPCKp1F	AAAAATAAAATAgAAATggAAgTTgAAgg
	SmPEPCKp1R	ATgATTgTAATgCgtTATgTgAg
	SmPEPCKp2F	ATATACgtTgTggCCATgTgAgAgCA
	SmPEPCKp2R	AgAATggAAATgAAggAAAgtCggAATg
	SmPEPCKp3F	CAGgtCgTTCTTTgCTTCTCT
	SmPEPCKp3R	ATCAACCACATTTCACTATCATTACgtACTC
	SmPEPCKp1qF	TTgTTTTCACAgCATgCAATg
	SmPEPCKp1qR	TTTTTTCCTAAATCCTCggTTAATCTA
	SmPEPCKp3qF	ACACCTCCCgtTgACAgTCT
	SmPEPCKp3qR	CgCTgTACgtACCATgAggg
	UPM	CTAATACgtACTCACTATAgggC
	NUP	AAgtCgtTggTAACAACgtCgtAgT
	SmTubqPCRf	AgCgtTTAgtCgtTTgCgtAAATCA
	SmTubqPCRr	TgACgtAgggTCACATTTCACCAT

Results and Discussion

Molecular cloning and characterization of S. mansoni class III HDAC Sirt1 and the transcription factor FoxO.

The class III HDAC Sirt1 and the transcription factor FoxO of *S. mansoni* were initially identified by screening the available EST and genomic databases with the peptide sequences of human Sirt1 and *C. elegans* DAF-16 using tblastn. ESTs and genomic contigs detected in this screen are listed in Table 2. Complete cDNA sequences were compiled using 5' and 3' RACE and the coding sequences were amplified from cDNA. These sequences were submitted to GenBank with the accession numbers DQ673625 (SmSirt1) and DQ673626 (SmFoxO).

Table 2. ESTs and genomic contigs encoding *S. mansoni* Sirt1 and FoxO

cDNA (size in bp)	EST (size in bp)	EST alignment	Alignment to full-length cDNA	Genomic contig ¹ (Size in bp)
SmSirt1 (1832)	TC15987 (486)	27-486	87-546	Smp_contig008644 (25481)
SmFoxO (3122)	TC10709 ² (1796)	1-1796	221-2016	Smp_contig018687 (30511)

¹Contig numbers given are from *S. mansoni* genome assembly 3.1

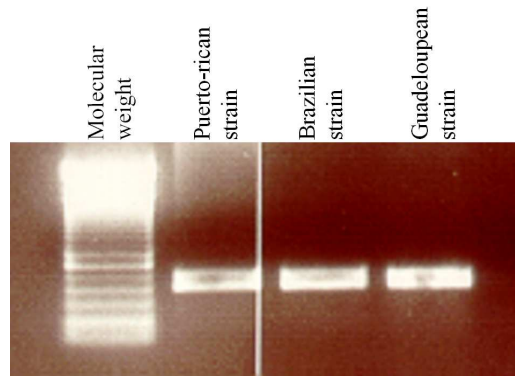
²This EST contig number is no longer valid. The current EST contig number is TC43859

The SmSirt1 transcript (1832 nt) encodes a peptide sequence of 568 aa. The alignment of the catalytic domain of SmSirt1 (aa183-466) with orthologues from *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* is shown in Fig. 1A. Although this domain is well conserved, showing an overall sequence identity of about 70% compared to all three sequences, it also has a large insertion (63 aa), not shared with Sirt1 orthologues. This insertion contains a putative PEST motif (KVDPSSLLPDEMNDSESTNH) at its N-terminal, characterized by an enrichment for proline, glutamate (or aspartate), serine and threonine, flanked by lysine, asparagine or histidine residues, that targets proteins for rapid destruction [26]. The insertion further contains a C-terminal phosphorylation motif for PKB/Akt (Fig. 1A) that is also absent from all orthologues examined. However, we were concerned that this insertion might represent either a cloning artefact, a splice variant or be specific for the Puerto-Rican strain of *S. mansoni* maintained in our laboratory. We therefore performed PCR, using primers flanking the insertion, on cDNAs from our strain and two isolates from Guadeloupe and Brazil (kind gifts from E. Roger and G. Mitta, UMR 5244, CNRS EPHE, University of Perpignan). The results (Fig. 1B) show that the same fragment is obtained whatever the *S. mansoni* strain used, indicating that the only transcript produced contains the insertion.

A

SmSirt1	TSILVITGAGISVSCGIPDFRSRDGIYARL	SRDYPDLSSPQAMFDMSYFKRNP	IPFFKFAKELFPGQF	~SPSITHRMIA	232			
CeSir2	KHILVLTGAGVSVSCGIPDFRS	KDGIYARLRS	EPDLDPITAMFDIRYFR	ENPAPPYNFAREIFPGQF	~VPSVSHRFIK	223		
DmSir2	QKIIVLTGAGVSVSCGIPDFRS	TNGIYARLA	EDFDPDPQAMFDI	NYFKRDPRPFYKFAREIYPG	EFQFQPSFCHRFIK	299		
HsSirt1	KKIIVLTGAGVSVSCGIPDFRSRDGIYARLA	VDFPDLDPQAMFDI	EYFRK	DPRPFFKFAKEIYPGQF	~QPSLCHRFIA	139		
				PEST motif				
SmSirt1	LLESKDKLLRNYTONIDTLEQ	AAGITRLLIQCHGSFA	SATCTNCKLKVSSDF	LKEALFTOSIPRCTN	CWPSKVDPSSLLPD	312		
CeSir2	ELETSCRRLLRNYTONIDTLE	HQTGIKRVVECHGSFS	KCTCTRCGQKYDGN	EIREVFLAMRVAHCKRC	EG~~~~~	292		
DmSir2	MLETGKLLRNYTONIDTLE	RVAGIORVIECHGSF	STASCTKCRFK	CNADALRADTFAQRIP	VCPCQPNKEQSVDA	379		
HsSirt1	LSDKEGKLLRNYTONIDTLEQVAGIQR	TIQCHGSFATASC	LI	CKVKVDCBAVRGALF	SOVVPRCPRCPA~~~~~	DEPLA	213	
				PEST motif	PKB motif			
SmSirt1	EMNDSESTNHS	SDLSTVEENPNNNNSNNMSVD	TSPKVKSKRTNKSRRRLASYG	VLPKDIVFFGEG	LSNEFFD	SLSNDIK	392	
CeSir2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	VLPKNIVFFGE	DLGREFH	QHVTEDKH	318	
DmSir2	VTEBELRQLVE	NG	~~~~~	IMKPDIVFFGEG	LP	DEYHTVMA	TDKD	418
HsSirt1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	IMKPEIVFFGE	NLPEQFHR	RAMKYDKD	239	
SmSirt1	QTDLVLVIGSSLKVRPV	SHIPNAVPRQVPQILINREPL	SNHDFDVELLGD	CDVI	VSELCHRLG		455	
CeSir2	KVDLIVVIGSSLKVRPVALIP	HCVDKNVPQILINRE	SLPHYNADELLG	NCDIIR	DICFSLG		381	
DmSir2	VCDLLIVIGSSLKVRPVAHIPSSIP	ATVPQILINRE	QLHHLKFDVELLGD	SDVIIN	QICHRLS		481	
HsSirt1	EVDLLIVIGSSLKVRPVALIPSSIP	HEVPQILINREPLPHL	HFDVELLGD	CDVIINEL	CHRLG		302	

B



C

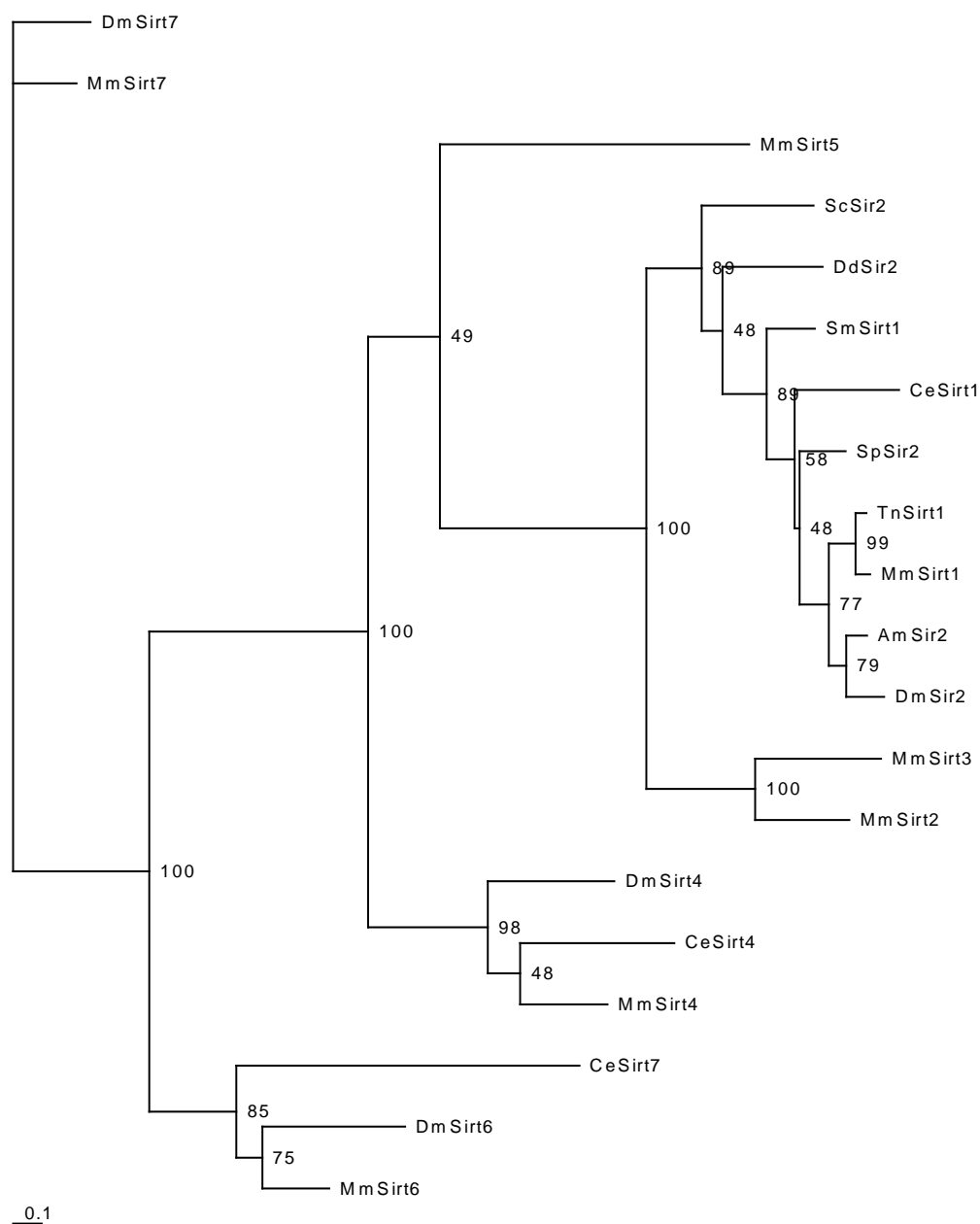


Fig. 1. The catalytic domain of SmSirt1 is conserved but contains a large insertion. **(A)** Alignment of the catalytic domain of SmSirt1 with those of *C. elegans* Sir2/Sirt1 (CeSir2; accession number Q21921), *D. melanogaster* Sir2 (DmSir2; NP_477351) and *Homo sapiens* Sirt1 (HsSirt1; AAH12499). The positions of conserved introns relative to the peptide sequence are shown by grey arrows. The star indicates the N247 residue mutated to ablate catalytic activity. The locations of a putative PEST motif and a PKB/Akt phosphorylation motif within the insertion are shown. **(B)** The catalytic domain insertion is present in different *S. mansoni* strains. Oligonucleotide primers flanking the insertion (Table 1) were used to amplify cDNA from the Puerto-Rican strain used to clone SmSirt1 and from two isolates from Guadeloupe and Brazil (gifts from E. Roger and G. Mitta, UMR 5244, CNRS EPHE, University of Perpignan). The same fragment is present in all the PCR reactions indicating that the insertion is not strain-specific. **(C)** Phylogenetic analysis of the catalytic domain confirms the identity of SmSirt1. The tree generated by PhymI is shown (Materials and Methods). Sequences used in the analysis were Mouse Sirt1 (MmSirt1; accession number NP_062786) Sirt2 (MmSirt2; AAH21439) Sirt3 (MmSirt3; NP_07878) Sirt4 (MmSirt4;

XP_485674) Sirt5 (MmSirt5; NP_849179) Sirt 6 (MmSirt6; AAH52763) Sirt7 (MmSirt7; AAP83960) *C. elegans* Sirt1 (CeSirt1; Q21921) Sirt4 (CeSirt4; CAE46663) Sirt7 (CeSirt7; AAK68163) *D. melanogaster* Sir2 (DmSir2; NP_477351) Sirt6 (DmSirt6; NP_649990) Sirt7 (DmSirt7; NP_651664) *Apis mellifera* Sir2 (AmSir2; XP_395386) *Tetraodon nigroviridis* Sirt1 (TnSirt1; CAG04727) *Strongylocentrotus purpuratus* Sir2 (SpSir2; XP_796354) *Dictyostelium discoideum* Sir2 (DdSir2; XP_635962) and *Saccharomyces cerevisiae* Sir2 (ScSir2; CAA96447).

That the insertion is not encoded by an alternatively spliced exon is supported by the structure of the *SmSirt1* gene (Table 3). This shows that the insertion is encoded within exon 5 and is flanked in this exon by conserved catalytic domain sequences. The positions of 3 introns within the sequences encoding the catalytic domain are shown (grey arrows) on Fig. 1A. Interestingly, only the first of these (corresponding to intron 3 of the *SmSirt1* gene) is conserved in the *C. elegans* *Sirt1* gene, none are conserved in the *Drosophila* orthologue (*DmSir2*) but all three positions are perfectly conserved in the human *Sirt1* gene (not shown). Analysis of the *S. mansoni* genome assembly shows that *SmSirt1* is a single copy gene. Finally, phylogenetic analysis (Fig. 1C) based on the conserved catalytic domain (not including the insertion) shows that SmSirt1 clusters with Sirt1 (sir2) sequences from other species, confirming its identity.

Table 3. Structure of the *SmSirt1* gene

Scaffold (size)	Exon sequence limits	Exon size	Intron size	cDNA sequence limits	Coding sequence	Peptide sequence
Smp_scaff000065 (493106bp)	321875-321852	24		2-25		
	317464-317209	256	4388	26-281	1-247	1-82
	310032-309635	398	7177	282-679	248-645	83-215
	308141-307994	148	1494	680-827	646-793	216-264
	305306-304860	447	2688	828-1274	794-1240	265-413
	302532-301975	558	2328	1275-1832	1241-1704	413-568

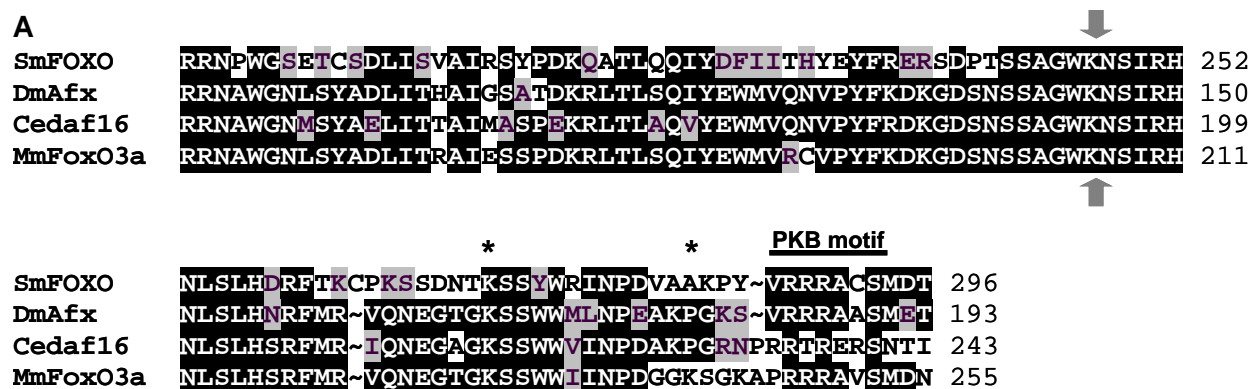
¹ *S. mansoni* genome scaffolds version 3.1 (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_mansoni)

² Bold type indicates conserved introns.

Gene size : 19901bp

The full-length cDNA sequence of SmFoxO (3122 nt) encodes a protein of 883 aa. Within this sequence, only the forkhead box (FHB), the DNA-binding domain (aa 193-296), shows sequence conservation compared to orthologues (Fig. 2A). Phylogenetic analysis based on the FHB domain (Fig. 2B) shows that SmFoxO, although clearly within the FoxO family, is more divergent than any of the representatives from other species, including insect (*D. melanogaster* and *Tribolium castaneum*) and nematode (*C. elegans*) sequences.

However, although the overall conservation (about 55% sequence identity) of the SmFoxO FHB is weaker than that of the *D. melanogaster*, *C. elegans* and mouse FoxO3a sequences compared to each other, it contains a conserved PKB phosphorylation motif (RXRXXS/T; [27]) and lysine residues that can be acetylated in mouse FoxO1 [10]. However, all mouse and human FoxOs have three consensus PKB phosphorylation motifs [27], one in the N-terminal region, one within the FHB and the third just downstream of the FHB. SmFoxO in contrast only has two such sites (RPRAMT₁₅₆ and RRRACS₂₉₃). The conservation of these motifs suggests a potential for the regulation of SmFoxO activity in a manner similar to but subtly different from mammalian FoxO. The sequences flanking the FHB show no significant conservation, as is the case with the orthologues from other species. However, murine FoxO1 has been shown to interact with Sirt1 via an LXXLL motif C-terminal to the FHB [28] and this motif is conserved in all human and mouse FoxOs. As in the cases of *Drosophila* and *C. elegans* FoxOs [28], the LXXLL motif is absent from SmFoxO, again suggesting subtle differences in the mode of regulation of SmFoxO activity.



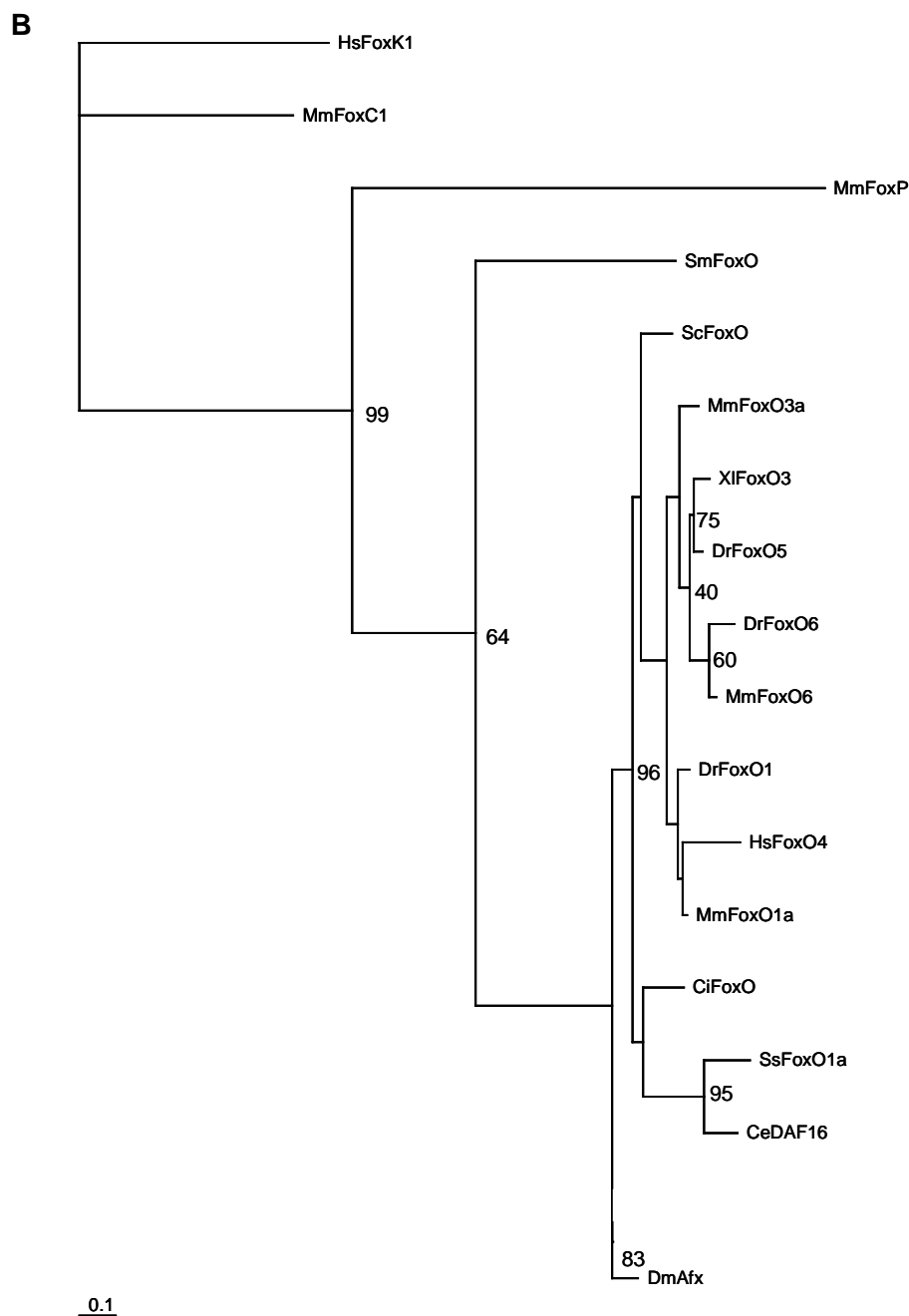


Fig. 2. The Forkhead Box of SmFoxO is conserved. **(A)** Alignment of the Forkhead box (FHB) of SmFoxO with those of *D. melanogaster* Afx (DmAfx; accession number AAL28078), *C. elegans* daf-16 (Cedaf16; NP_492815) and mouse FoxO3a (MmFoxO3a; NP_062714). The location of a putative PKB/Akt phosphorylation motif is indicated and possible acetylation sites are starred. The position of the conserved intron relative to the peptide sequence is shown by grey arrows. **(B)** Phylogenetic analysis of the FHB shows that SmFoxO is a divergent member of the FoxO family. The tree generated by Phym1 is shown (Materials and Methods). Sequences used in the analysis were as above and *T. castaneum* FoxO (TcFoxO; XP_975200) *Strongyloides stercoralis* FoxO1a (SsFoxO1a; AAQ23179) *Ciona intestinalis* FoxO (CiFoxO; BAE06450) mouse FoxO1a (MmFoxO1a; NP_062713) FoxO6 (MmFoxO6; CAE00176) human FoxO4 (HsFoxO4; P98177) *Danio rerio* FoxO1 (DfFoxO1; XP_696372) FoxO5 (DrFoxO5; NP_571160) FoxO6 (DrFoxO6; XP_690445) *Xenopus laevis* FoxO3 (XIFoxO3; AJ783964) *S. centrotus* FoxO (ScFoxO; ABB89484) along with the following sequences used as outgroups: mouse FoxP (MmFoxP; NM_053202) FoxC1 (MmFoxC1; NP_032618) and human FoxK1 (HsFoxK1; NP_001032242).

A search of the *S. mansoni* genome database (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_mansoni) showed that the *SmFoxO* gene comprises 3 exons and that it is present as a single copy. However, the first exon is present on one scaffold, and the two 3' exons are on a separate scaffold (Table 4). Moreover, assuming that the two scaffolds are contiguous, the minimum size of the first intron would be about 1.3 Mbp, much larger than the largest introns discovered during the assembly of the genome (33.8 Kbp; [29]) or by analysis of *S. mansoni* *Hox* genes (45 Kbp for *SmHox8*; [30]). Since we were able to amplify the complete *SmFoxO* coding sequence from adult worm cDNA, and the large intron (grey arrow, Fig. 2A) is located within the sequence encoding the conserved FHB, it seems unlikely that the *SmFoxO* sequence we obtained is chimeric. However, we further investigated the seemingly anomalous structure of the *SmFoxO* gene by comparing it to those of orthologues from *D. melanogaster*, *C. elegans* and *H. sapiens* (Table 4). Like *S. mansoni*, *D. melanogaster* (*Afx*) and *C. elegans* (*daf-16*) have only one representative of FoxO, whereas four (FoxO1, 3, 4 and 6) are present in mammals. Both the *D. melanogaster* *Afx* and *C. elegans* *daf-16* genes are composed of 11 exons but intron 4 of the former and intron 6 of the latter are positioned identically to the gigantic intron 1 of the *SmFoxO* gene (Fig. 2A). Human *FoxO1* and *FoxO3a* genes have 3 exons, like *SmFoxO*, and in both cases the first intron is positioned identically with respect to the coding sequence as in the schistosome gene. Moreover, in both cases, this intron is by far the larger of the two introns present at >100 Kbp. The human *FoxO4* and *6* genes are smaller and have 4 and 2 exons respectively. Here again the positions of intron 2 of the *FoxO4* gene and of the unique intron of the *FoxO6* gene are identical to that of the *SmFoxO* intron 1. We therefore conclude that the gene structure of *SmFoxO* is likely to be correct, and that the large size of intron 1 is consistent with orthologous genes in mammals even though its exact size requires verification.

Table 4. Structure of the *FoxO* genes

Gene/Scaffold (size) ¹	Exon sequence limits	Exon size	Intron size	cDNA sequence limits	Coding sequence	Peptide sequence
<i>SmFoxO</i>						
Smp_scaff0000210 (416438)	314230-315078	849 ³		1-849	1-740	1-246
Smp_scaff0000020 (1504024)	247528-246852	674	1357856²	850-1523	741-1414	247-471
Gene size > 1365686 bp	242149-240546	1599	4703	1524-3122	1415-2649	472-883
<i>DmAfx</i>⁴						
NT_033777.2 (34127bp)	1568-1624	57		1-57		
	2474-2707	234	850	58-291		
	11141-11462	322	8434	292-613	1-220	1-73
	11538-11752	215	76	614-828	221-435	74-145

	23946-24238	293	12194	829-1121	436-728	146-242
	24839-25063	225	601	1122-1346	729-953	243-317
	25311-25515	205	248	1347-1551	954-1158	318-386
	25604-25787	184	89	1552-1735	1159-1342	387-447
	25934-26031	98	147	1736-1833	1343-1440	448-480
	26097-26786	689	66	1834-2522	1441-1839	481-613
	31576-32576	1001	4790	2523-3523		
Cedaf-16⁴						
NC_003279.6 (28742bp)	1307-1392	86		1-86	1-24	1-8
	1631-1721	91	239	87-177	25-115	9-38
	1775-1925	151	54	178-328	116-266	39-88
	14327-14443	117	12402	329-445	267-383	89-127
	15088-15233	146	645	446-591	384-529	128-176
	15947-16020	74	714	592-665	530-603	177-201
	23967-23858	162	7947	666-827	604-765	202-255
	24021-24202	182	163	828-1009	766-947	256-315
	24262-24481	220	60	1010-1229	948-1167	316-389
	24731-24843	113	250	1230-1342	1168-1280	390-426
	25514-25787	274	671	1343-1616	1281-1551	427-517
HsFoxO1 NC_000013.10 (122025bp)	116480- 115466	1015		1-1015	1-630	1-210
	10743-9392	1352	104723	1016-2367	631-1965	221-655
	8917-5545	3371	475	2368-5738		
HsFoxO3a NC_000006.11 (137439bp)	7291-8254	964		1-964	1-621	1-307
	109880- 111314	1435	101626	965-2399	622-2019	308-673
	126252- 131193	4942	14938	2400-7341		
HsFoxO4 NC_000023.10 (8092bp)	368-1173	806		1-806	1-453	1-151
	4876-5932	1057	3703	807-1863	454-1510	152-503
	6269-7726	1458	337	1864-3321	1511-1515	503-505
HsFoxO6 NC_000001.10 ⁵ (22824bp)	1038-1451	414		1-414	1-414	1-138
	20723-21788	1065	19272	415-1479	415-1476	139-492

¹ *S. mansoni* genome scaffolds version 3.1 (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_mansoni)

² Minimum size based on scaffolds. Probable assembly errors

³ Bold type indicates conserved intron.

⁴ One of 5 possible splicing isoforms shown

⁵ Only the coding sequence has been mapped to the genome.

SmSIRT1 and SmFOXO mRNA expression during the parasite life-cycle.

Quantitative real-time PCR was carried out to determine the levels of expression of SmSirt1 and SmFoxO mRNAs during the parasite life-cycle. The expression profiles obtained (Fig. 3) are quite distinct. The highest level of SmSirt1 transcript expression is present in miracidia and the lowest in cercariae. This pattern of expression has also been evidenced for mRNAs encoding a variety of *S. mansoni* proteins including the transcriptional co-activators SmCBP1, SmCBP2 and SmGCN5 [17, 31]. This may be due to the stocking of mRNA that is translated upon invasion of the snail host, but it is not clear, in the case of Sirt1, why cercarial

expression should be so low. SmFoxO mRNA levels, on the other hand, were much higher in cercariae than in any other life-cycle stage. It is clear that the transcript expression profiles of these potentially interacting proteins are independent. This would be expected, given the multiplicity of roles that both proteins have in cells [32, 33 for reviews] that may or may not involve their direct interaction.

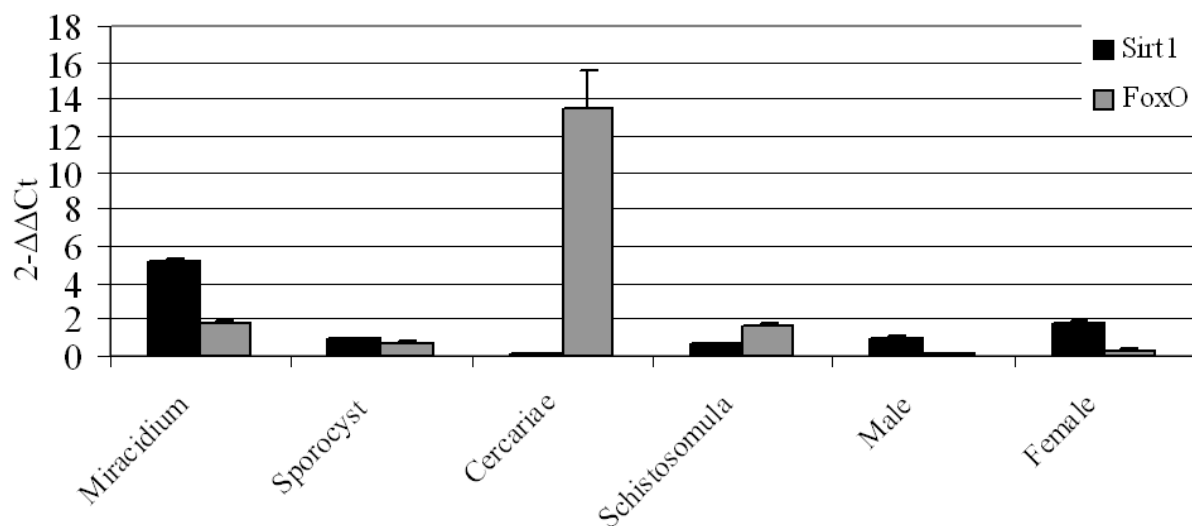


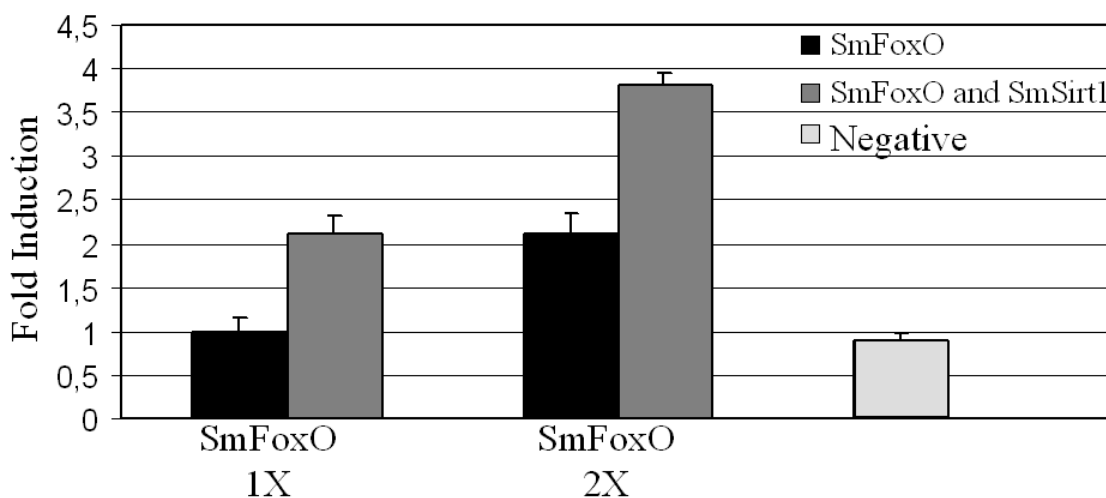
Fig. 3. Comparison of the transcript levels of SmSirt1 and SmFoxO during the schistosome life-cycle. Expression levels, calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Materials and Methods), are relative to Sirt1 expression in male worms.

SmSirt1 potentiates transcriptional activation by FoxO

In order to test whether SmFoxO was capable of activating transcription in a similar manner to its orthologues, we carried out co-transfection assays in mammalian cell lines using vectors expressing either SmFoxO, murine FoxO3a (MmFoxO1) or the reporter gene encoding luciferase under the control of a promoter containing three copies of the murine IGFBP1 promoter FoxO response element ([24] a kind gift from Prof. A. Fukamizu). In these assays SmFoxO consistently activated luciferase expression in a dose-dependent manner (Fig. 4), although much less efficiently than MmFoxO3a. We next tested the influence of SmSirt1 on this transcription using the vector expressing SmSirt1 and another expressing a catalytic mutant [34] in which the Asn247 residue was substituted by an Ala residue. This mutation completely abolishes the catalytic activity of the yeast Sirt1 orthologue Hst2 [34]. Co-transfection of SmSirt1 with SmFoxO (Fig. 4A) or MmFoxO1 (Fig. 4B) led to an enhanced level of transcription from the reporter plasmid, in line with previous observations [10]. Moreover, the catalytic site mutant failed to enhance transcription dependent on MmFoxO1 (Fig. 4B). Taken together, our results show that SmFoxO can act as a transcriptional activator on the response element for mammalian FoxO1 and that this activity can be modulated by SmSirt1. However, the level of transcription obtained was much lower than

with the mouse FoxO1 and this may be due to two factors. The first concerns the level of expression of the schistosome protein in mammalian cells. This is often problematic for schistosome proteins, due to the enrichment of coding sequences in A+T (65% overall [29] and the consequent codon usage bias [35] that is different from that of mammals. Indeed, we were unable to detect the expression of SmFoxO in transfected mammalian cells, whilst the expression of the mouse protein was readily detectable (not shown). The second potential explanation for a lower level of transcriptional activity of the schistosome FoxO is that the response element, although recognized, is not optimal. This next led us to search for FoxO response elements in the promoter regions of potential schistosome target genes.

A



B

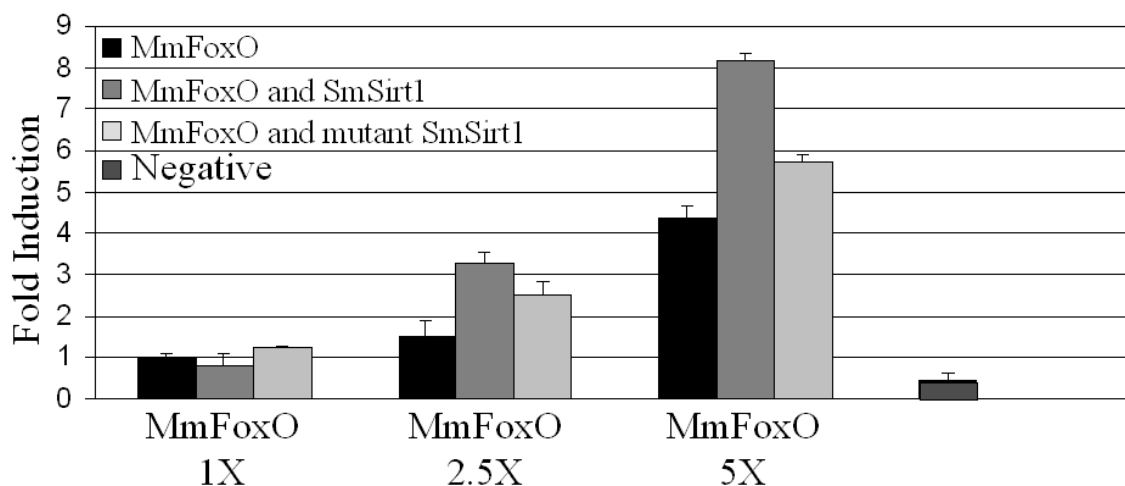


Fig. 4. Transactivation of transcription by SmFoxO and the influence of SmSirt1. **(A)** Transcription of the luciferase reporter gene (Materials and Methods) is controlled by SmFoxO in a dose-dependent manner and transcription is enhanced by the co-transfection of an SmSirt1-expressing plasmid. The background transcription level is indicated by transfection with the reporter plasmid and the empty vector. **(B)** SmSirt1 enhances transcription controlled by mouse FoxO1. Co-transfection of the SmSirt1 expression vector consistently increases transcription controlled by MmFoxO1 and this effect is abolished in the SmSirt1 catalytic mutant. Results shown are representative of at least 3 independent experiments.

Identification of potential *S. mansoni* target genes of SmFOXO.

The core sequence recognized by daf-16 and three mammalian orthologues was defined as TTGTTTAC [36] named the daf-16 family binding element or DBE. However, variants are possible and the so-called “insulin response sequence” or IRS, notably found in the promoter of the mouse glucose-6-phosphatase gene [37] has the consensus sequence TT(G/A)TTT(T/G)(G/T). Using a bioinformatics approach [38] a co-binding site (ACGT(C/G/T)(A/C/G)(A/T)) has also been defined that can be up- or downstream of the DBE or IRS. In order to identify potential binding sites for SmFoxO in target genes, we screened the promoter regions up to 6300 bp upstream of the transcription initiation sites of three putative target genes for which complete cDNA sequences exist, encoding the two Insulin Receptor-like receptor tyrosine kinases SmIR-1 and SmIR-2 (AF314754, AY649844; [39]) and PEPCK (AF120929). FoxO family members regulate the expression of the genes encoding the insulin receptor in *Drosophila* [40] and PEPCK in mammals [41] among other genes encoding gluconeogenic enzymes. The cDNA sequences were used to screen the *S. mansoni* genomic contig database (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_mansoni). Promoter regions were screened in two ways. An initial screen against *S. mansoni* nucleotide sequences in the GenBank database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) was done in order to identify repetitive sequences in the promoter regions. A manual screen was then carried out for FoxO core binding site and accessory sequences. Tables 5, 6, and 7 show the results of these screens. It is quite possible that FoxO binding sites contained in repetitive sequences could be functional and for this reason, they are included in the Tables. However, it is impossible to utilize repetitive sequences in ChIP analysis due to the increased background amplification incurred. We therefore chose the non-repetitive sequences in which a core binding site was close to an accessory binding site for analysis of occupancy *in vivo* by SmFoxO and SmSirt1. In the *SmIR-1* promoter we identified 2 potential fixation sites that were analysable and in *SmIR2* and *SmPEPCK* respectively 1 and 3 sites were identified. In a comparative analysis of the IGF receptor promoters [38] one or two highly conserved response element/accessory site pairs were generally found in species from *Caenorhabditis* to *Homo*.

Table 5. SmIR1 promoter – 2629 bp

Limits ¹	FoxO RE ²	Limits	Co-binding site ²	Limits ¹	Repeat element	Limits ¹	Oligonucleotides for ChIP(5'-3')
47-54	TTGTTTgt ³			1-176	BK004067 (Smperere)		
153-160	aTGTTTaa						
		167-176	ttGCTGtc				
269-276	TTGTTTg			262-617	BK004067		
538-	aTGTTTgt						

515							
1041-1048	aTGTTTAA						
		1091-1098	agGCTGag				
		1279-1286	agGCTGaA	P2 promoter region	f1218-1241	AGGGTTATGTGGGTA GGGCTCAAT	
1309-1316	gTGTTTTc						
1632-1639	TTGTTTcC				r1659-1632	CAGACTAGAACGCACA TAATGGAAACAA	
		1815-1822	acGCTGaA	1736-1975	BK000439 (Boudicca)		
		2035-2042	aAGCTGtt				
		2095-2100	ttGCTG aA				
2405-2412	cTGTTTTc			P1 promoter region	f2325-2345	AGCTCTTCTGTATTCC TTTTT	
					r2573-2553	CTTTTTGTTGCTTCAG TCTTA	

¹Numbering is from the 5' end of the region considered and terminates at the transcription initiation site

²Capitals indicate residues coinciding with consensus response element or co-binding site

³Red blocks indicate response elements contained within repetitive sequences. Green blocks indicate response elements within non-repetitive regions

Table 6. SmIR2 promoter – 4560 bp

Limits	FoxO RE	Limits	Co-binding site	Limits	Repeat element	Limits	Oligonucleotides for ChIP(5'-3')
				471-2781	SMU66331		
		2018-2025	aAGCTGCt		(SmSR1)		
		2295-2302	atGCTGCA				
2404-2411	aTGTTTgt						
2651-2658	cTGTTTga						
		2644-2651	aAGCTGac				
		2763-2770	agGCTGtt				
2819-2826	cTGTTTct						
4298-4305	TTGTTTTa			P1 promoter region		f4089-4111	ATCAAGATCAAACATA AAAGAGC
		4357-4364	atGCTGat			r4426-4404	ATAACTAAACTGGGGT GACATAA

Indications as for Table 5

Table 7. SmPEPCK promoter – 6302 bp

Limits	FoxO RE	Limits	Co-binding site	Limits	Repeat element	Limits	Oligonucleotides for ChIP(5'-3')
				26-275	AB231864		
610-617	TTGTTTTc					f308-331	TTTGCAAATATCAGTC CATCGTCT
						r657-628	ACCTTCAACTTCCATT TCTATTTTATTTTT
		860-867	atGCTGtt	P3 promoter region		f628-656	AAAAATAAAATAGAAA TGGAAGTTGAAGG

971-978	TTGTTTC						
1057-1064	TTGTTTgC						
		1110-1117	acGCTGCA			r1127-1103	ATGATTGTAATGCAGC GTATGTGAG
				1222-1430	AB231864		
		1336-1343	CtGCTGag				
1458-1465	TTGTTTAt						
		1582-1589	CAGCTGac				
1688-1695	TTGTTTTt						
1699-1706	TTGTTTTg						
				1732-2121	AB231864		
2236-2243	TTGTTTAt			P2 promoter region		r2046-2070	ATATACGTGTGGCCAT GTGAGAGCA
2304-2311	TTGTTTTg						
		2338-2345	atGCTGac			r2372-2345	AGAATGGAAATGAAGG AAAGGCGGAATG
2552-2559	gTGTTTC					r2346-2374	ATTCCGCCTTTCCTTC ATTCCATTCTCT
						r2609-2580	TTATTATTATTATT GACAAAACCTTAT
4023-4031	gTGTTTAt			P1 promoter region		r3966-3985	CAGGCGTTCCTTGCTT CTCT
		4066-4073	CcGCTGat				
4265-4272	aTGTTTTt					r4361-4332	ATCAACCACATTTAC TATCATTACGACTC
		4803-4810	CAGCTGat				
		5185-5192	ttGCTGaA				
		5348-5355	ttGCTGaA				
5539-5546	cTGTTTTa						
				5565-5622	AF412214		

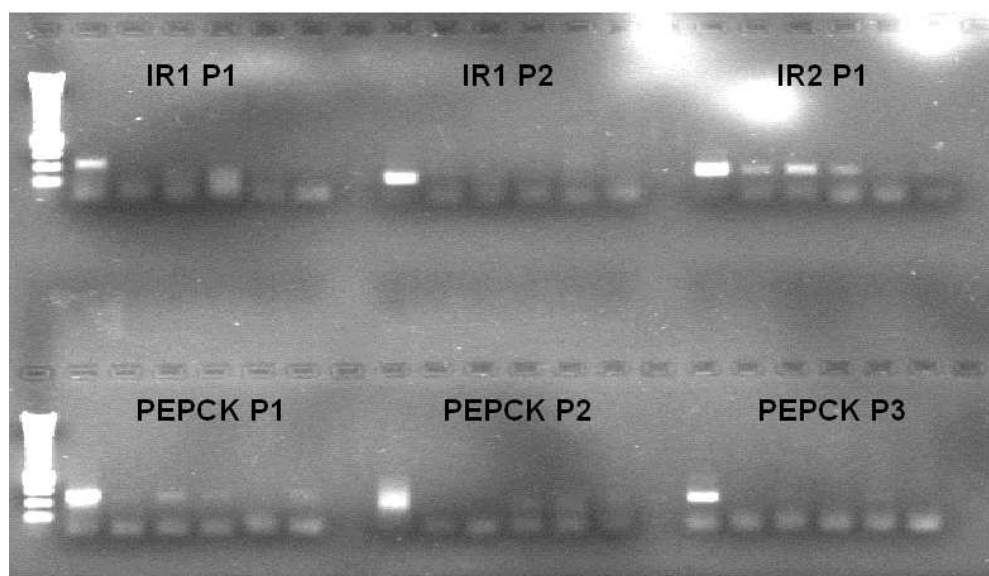
Indications as for Table 5

SmFOXO and *SmSIRT1* are present on *SmPEPCK* and *SmIR* promoters in schistosomes.

In order to test whether *SmFoxO* and *SmSirt1* were bound at the FoxO response elements that we detected in the promoters of *SmIR*-1, *SmIR*-2 and *SmPEPCK*, we performed ChIP and quantitative ChIP using the specific antibodies to the two proteins and oligonucleotide primers defined in Tables 5, 6 and 7. In all, two sites were examined for *SmIR*-1, two for *SmIR*-2 and three for *SmPEPCK* (Fig. 5). Our results showed that depending on the promoter region, *SmFOXO* and *SmSIRT1* bound differentially to DNA, alone or at the same region. Initial ChIP results (Fig. 5A) showed that binding of both *SmFoxO* and *SmSirt1* was detectable on the proximal promoters of *SmIR*-2 and *SmPEPCK*,

but not on either site tested for the SmIR-1 promoter. Q-PCR confirmed these results and further showed that binding of SmFoxO, but not SmSirt1, was detectable on the region encompassing a response element at about -1000 relative to the transcription initiation site on the SmIR1 promoter. These results suggest that SmFoxO and SmSirt1 are indeed involved in the control of expression of SmPEPCK and, particularly, SmIR-2 and that SmFoxO is capable of binding to response elements that do not correspond exactly to the classical DBE [36]. Although more information is needed on further SmFoxO binding sites, the consensus response element that can be deduced from our results so far is TTGTTT(A,T,C)(A,T,C). Interestingly, SmFoxO and SmSirt1 were detected together on the SmIR-2 proximal promoter and not on that of SmIR-1. SmIR-1 is localized principally in muscle, the intestinal epithelium and in the basal tegumental membrane, whereas SmIR-2 is massively expressed in parenchymal cells of adult worms [39]. The presence of two members of the insulin receptor family (the only such duplication so far described in invertebrates) and their differential localization has led to speculation that SmIR-1 would have functions similar to the mammalian IR, whereas SmIR-2 would fulfil functions similar to those of IGF receptors in mammals [42]. In this respect it is interesting that SmFoxO and SmSirt1 bound more abundantly to the promoter of SmIR-2, suggesting that, at least in adult worms, they are more involved in the regulation of growth control, than in that of glucose uptake from the external environment. However, the role of external insulin signalling on the SmIR-1 signalling pathway and more particularly on the transcriptional activity of SmFoxO remains to be determined.

A



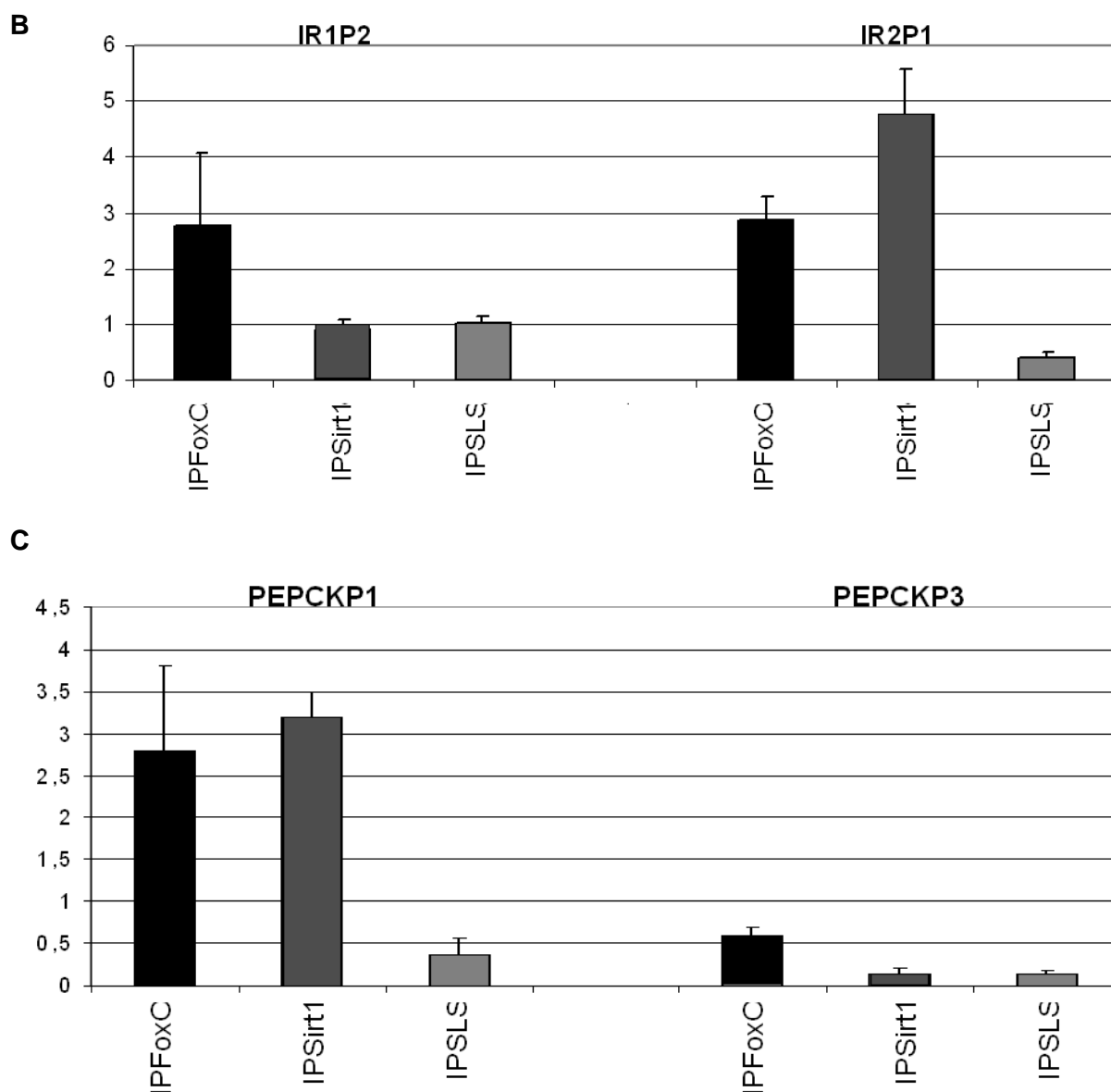


Fig. 5. SmFoxO and SmSirt1 occupy the promoters of SmFoxO target genes. **(A)** ChIP results for several regions of the promoters of *SmIR1*, *SmIR2* and *SmPEPCK* genes (see Tables 5, 6 and 7 for details of the regions analysed). For each promoter Lane 1: input; Lane 2: immunoprecipitation with pre-immune rabbit serum; Lane 3: IP rabbit anti-SmFoxO; Lane 4: IP rabbit anti-SmSirt1; Lane 5: pre-immune chicken serum; Lane 6: chicken anti-SmSirt1. **(B)** Q-ChIP analysis of the *SmIR1* P2 and *SmIR2* P1 regions. Results shown are the percentage of input immunoprecipitated (see [25] for methods used; only rabbit antisera were used). **(C)** Q-ChIP analysis of two regions of the *SmPEPCK* gene showing occupation of the proximal promoter by both SmFoxO and SmSirt1. In all cases preimmune rabbit sera (SLS) were used as controls.

In conclusion, we have shown that SmFoxO and SmSirt1 have structural differences compared to their respective orthologues in other species. They are expressed at all parasite stages, and as would be expected, the levels of expression of their transcripts vary differentially during the parasite life-cycle. They interact functionally to drive transcription

from a promoter containing consensus FoxO response elements and the increase in transcriptional activity afforded by SmSirt1 in this system is dependent on the integrity of its catalytic domain. The finding that both SmFoxO and SmSirt1 are found occupying the same promoter regions, containing FoxO response elements, for both SmIR-2 and SmPEPCK suggests, but does not demonstrate, that they can interact functionally *in vivo*. Further work will investigate the role of insulin signalling in controlling the occupancy of promoters by SmFoxO and SmSirt1 and Re-ChIP assays will be used to determine the co-occupancy of promoter sites by both factors. Moreover, the physical interaction of SmSirt1 with SmFoxO will be investigated since the absence of an LXXLL motif in SmFoxO calls into question the reality and/or the mechanism of such an interaction. Since schistosomes have seemingly uncoupled the trade-off between longevity and fecundity via dietary restriction it is tempting to speculate that this would be in part due to the absence of control of SmFoxO activity via the insulin signalling pathway. The quasi absence of SmFoxO occupancy of SmIR-1 promoter sites may be an element in this mechanism and we will attempt to test this hypothesis.

Acknowledgements

The work was supported by Inserm (U547), the Institut Pasteur de Lille, the CNRS and the ANR (grant number ANR-07-BLAN-0119-02 2008-10, programme Schistophepigen). FD was supported by the MENRT and FO was supported by Inserm-Region Nord-Pas de Calais.

Bibliography

1. Gryseels B, Polman K, Cleerinx J, Kestens L. Human Schistosomiasis. *Lancet* 2006;368:1106-1118.
2. Doenhoff MJ, Kusel JR, Coles GC, Cioli D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel : is there a problem? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002;96:465-469.
3. Chabasse D, Bertrand G, Leroux J P, Gauthey N, Hocquet P. Developmental bilharziasis caused by *Schistosoma mansoni* discovered 37 years after infestation. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1985;78:643-647.
4. Bueding E. Carbohydrate metabolism of *Schistosoma mansoni*. *J Gen Physiol* 1950;33:475-495.
5. Bordone L, Guarente L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:298-305.
6. Tissenbaum HA, Guarente L. Model organisms as a guide to mammalian aging. *Dev Cell* 2002;2:9-19.

7. Morris BJ. A forkhead in the road to longevity: the molecular basis of lifespan becomes clearer. *J Hypertens* 2005;23:1285-1309.
8. Calnan DR, Brunet A. The FoxO code. *Oncogene* 2008;27:2276-2288.
9. Brooks CL, Gu W. How does Sirt1 affect metabolism, senescence and cancer? *Nat Reviews Cancer* 2009;9:123-128.
10. Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Aoyama H, Yoshimochi K, Fukamizu A. Acetylation of FoxO1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:11278-11283.
11. Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige J, Lagoge M, Noriega L, Milne J, Elliot PJ, Puigserver P, Auwerx J. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and Sirt1 activity. *Nature* 2009;458:1056-1060.
12. Ramalho-Pinto FJ, Gazzinelli G, Howells RE, Mota-Santos TA, Figueiredo EA, Pellegrino J. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule in vitro. *Exp Parasitol* 1974;36:360-372.
13. Smithers SR, Terry RJ. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology* 1965;55:695-700
14. Yoshino TP, Laursen JR. Production of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts from mother sporocysts maintained in synxenic culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cells. *J Parasitol* 1995;81:714-22.
15. Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press; 2001
16. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979;18:5294-5299
17. Bertin B, Oger F, Cornette J, Caby S, Noel C, Capron M, Fantappie MR, Rumjanek FD, Pierce RJ. *Schistosoma mansoni* CBP/p300 has a conserved domain structure and interacts functionally with the nuclear receptor SmFtz-F1, *Mol Biochem Parasitol* 2006;146:180-191.
18. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 2001;17:754-755.
19. Bahia D, Avelar L, Mortara RA, Khayath N, Yan Y, Noel C, Capron M, Dissous C, Pierce RJ, Oliveira G. SmPKC1, a new protein kinase C identified in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*, *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345:1138-1148.
20. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood, *Syst Biol* 2003;52:696-704.

21. Oger F, Bertin B, Caby S, Dalia-Cornette J, Adams M, Vicogne J, Capron M, Pierce RJ. Molecular cloning and characterization of *Schistosoma mansoni* Ftz-F1 interacting protein-1 (SmFIP-1), a novel corepressor of the nuclear receptor SmFtz-F1, Mol Biochem Parasitol 2006;148:10-23.
22. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001;29:e45
23. Roger E, Gourbal B, Grunau C, Pierce RJ, Galinier R, Mitta G. Expression analysis of highly polymorphic mucin proteins (SmPoMuc) from the parasite *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol 2008;157:217-227.
24. Daitoku H, Yamagata K, Matsuazaki H, Hatta M, Fukamizu A. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. Diabetes 2003; 52:642-649.
25. Caby S, Pierce RJ. Quantitative chromatin immunoprecipitation (Q-ChIP) applied to *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol 2009;166:77-80
26. Reichsteiner M, Rogers SW. PEST sequences and regulation by proteolysis. Trends Biochem Sci 1996;21:267-271.
27. Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? J Cell Sci 2001;114:2903-2910.
28. Nakae J, Cao Y, Daitoku H, Fukamizu A, Ogawa W, Yano Y, Hayashi Y. The LXXLL motif of murine forkhead transcription factor FoxO1 mediates Sirt1-dependent transcriptional activity. J Clin Invest 2006;116:2473-2483.
29. Berriman M, Haas B, Loverde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, Mashiyama ST, Al-Lazikani B, Andrade LF, Ashton PD, Aslett MA, Bartholomeu DC, Blandin G, Caffrey CR, Coghlan A, Day TA, Delcher A, De Marco R, Djikeng A, Eyre T, Gamble JA, Ghedin E, Gu Y, Hertz-Fowler C, Hirai H, Hirai Y, Houston R, Ivens A, Johnston D, Lacerda D, Macedo CD, McVeigh P, Ning Z, Oliveira G, Overington GP, Parkhill J, Perteza M, Pierce RJ, Protasio AV, Quail MA, Rajandream M-A, Rogers J, Sajid M, Salzberg SL, Stanke M, Tivey AR, White O, Williams DL, Wortman J, Wu W, Zamanian M, Zerlotini A, Fraser-Liggett CM, Barrell B.G, El-Sayed NM. The Genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. Nature, 2009;460 :352-358.
30. Pierce RJ, Wu W, Hirai H, Ivens A, Murphy LD, Noël C, Johnston DA, Artiguenave F, Adams M, Cornette J, Viscogliosi E, Capron M, Balavoine G. Evidence for a dispersed *Hox* gene cluster in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*: implications for the evolution of the cluster in the Lophotrochozoa. Mol Biol Evol, 2005;22:2491-2503.

31. de Moraes Maciel R, de Silva Dutra DL, Rumjanek FD, Juliano L, Juliano MA, Fantappie MR, *Schistosoma mansoni* histone acetyltransferase GCN5: linking histone acetylation to gene activation, *Mol Biochem Parasitol* 2004;133:131–135.
32. Finkel T, Deng C-X, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* 2009;460:587-591.
33. Arden KC. FoxO animal models reveal a variety of diverse roles for FoxO transcription factors. *Oncogene* 2008;27:2345-2350.
34. Khan AN, Lewis PN. Use of substrate analogs and mutagenesis to study substrate binding and catalysis in the Sir2 family of NAD-dependent protein deacetylases. *J Biol Chem* 2006;281:11702-11711.
35. Milhon JL, Tracy JW. Updated codon usage in *Schistosoma*. *Exp Parasitol* 1995;80:353-356.
36. Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, Mori N. Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J*. 2000;349:629-634.
37. Streeper RS, Svitek CA, Chapman S, Greenbaum LE, Taub R, O'Brien RM. A multicomponent insulin response sequence mediates a strong repression of mouse glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *J Biol Chem* 1997;272:11698-11701.
38. Xuan Z, Zhang MQ. From worm to human: bioinformatics approaches to identify FoxO target genes. *Mech Age Dev* 2005;126:209-215.
39. Khayath N, Vicogne J, Ahier A, BenYounes A, Konrad C, Trolet J, Viscogliosi E, Brehm K, Dissous C. Diversification of the insulin receptor family in the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *FEBS J* 2007;274:659-676.
40. Puig O, Tjian R. Transcriptional control of insulin receptor by dFoxO/FoxO1. *Genes Dev* 2005;19:2435-2446.
41. O'Brien RM, Granner DK. Regulation of gene expression by insulin. *Physiol Rev* 1996;76:1109-1161.
42. Dissous C, Ahier A, Khayath N. Protein tyrosine kinases as new potential targets against schistosomiasis. *Bioessays* 2007;29:1-8.

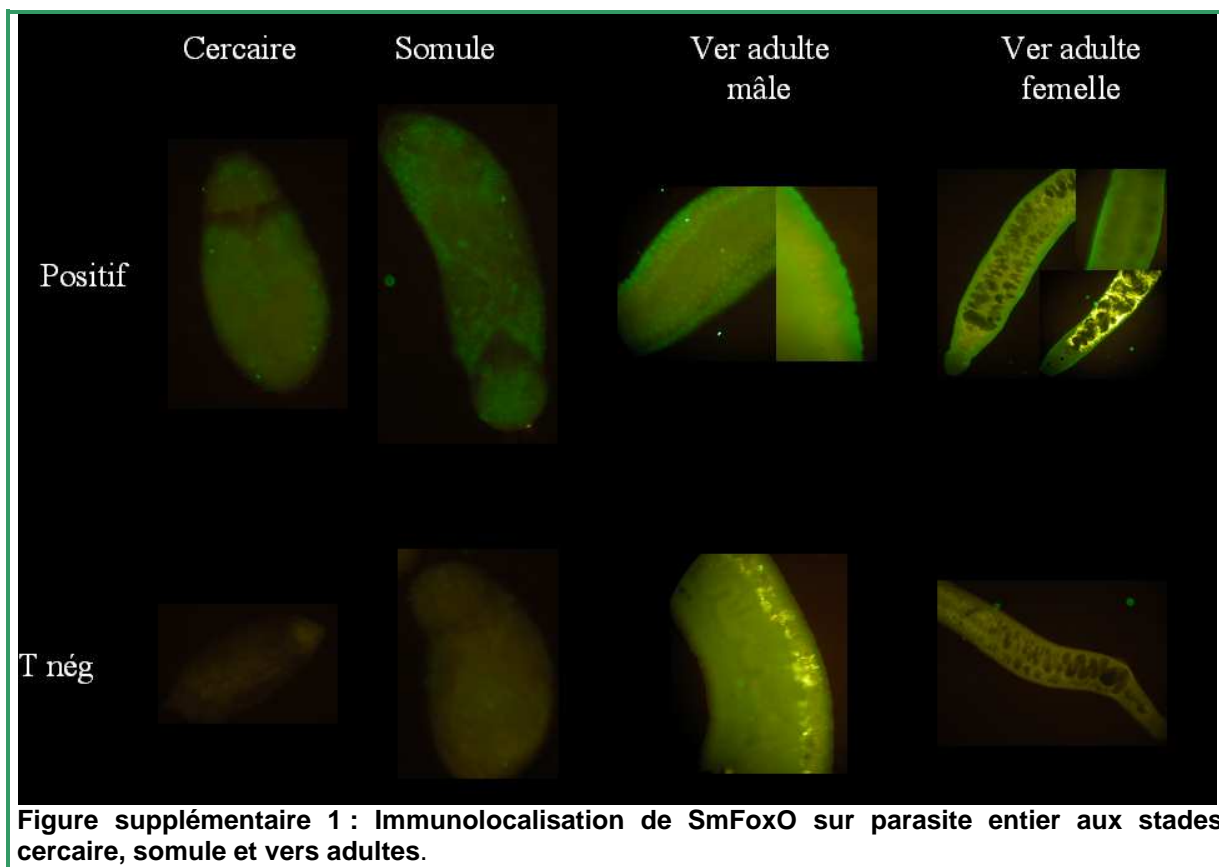
Discussion

Notre étude sur la HDAC de classe III SmSirt1 et le facteur de transcription SmFoxO chez *S. mansoni*, montre dans un premier temps une conservation globale des deux protéines avec cependant des différences structurales, qui ne remettent pas en cause l'identité de nos deux protéines. Dans le cas de SmFoxO le domaine *Forkhead Box* montre un niveau d'identité de séquence vis-à-vis de la protéine FoxO3a de la souris (MmFoxO3a) moins élevé que celui de la protéine DAF-16. Toutefois, certains motifs impliqués dans la régulation de l'activité des protéines FoxO, notamment les séquences cibles de protéine kinases, sont conservés chez SmFoxO. La régulation de l'activité transcriptionnelle de FoxO par la voie de signalisation dépendante de l'insuline s'effectue *via* la phosphorylation par PKB/Akt sur 3 sites consensus de type RXRXXS/T [Lawlor & Alessi, 2001] dont un dans le domaine *Forkhead Box*. Cette phosphorylation, particulièrement du site présent dans le domaine *Forkhead Box*, est favorisée par l'acétylation de trois résidus de lysine dans ce même domaine par CBP/p300 [Matsuzaki et al, 2005]. Deux de ces trois lysines sont présentes chez SmFoxO. Par ailleurs, d'autres protéines kinase phosphorylent également les facteurs FoxO, comme JNK [Greer & Brunet, 2005] et MST1 [Lehtinen et al, 2006]. La phosphorylation de FoxO par MST1 sur des résidus sérine présents dans le domaine *Forkhead Box* empêche son interaction avec les protéines 14-3-3, ce qui favorise la localisation nucléaire. L'invalidation de l'orthologue de MST1 chez *C. elegans*, CST1, réduit la durée de vie et accélère le vieillissement tissulaire, suggérant la conservation de cette fonction au cours de l'évolution. De plus, tous les sites phosphorylés par MST1 dans le domaine *Forkhead Box* sont conservés chez SmFoxO, et surtout le site majeur (S₂₀₇ de MmFoxO3a, S₂₄₉ de SmFoxO). Il semble, donc, que la régulation de SmFoxO par les voies de signalisation contrôlant la longévité soit bien conservée à travers diverses espèces. Par ailleurs, le criblage des séquences génomiques de *S. mansoni* a permis de mettre en évidence l'orthologue de MST1 chez le parasite. En revanche, la conservation globale du domaine *Forkhead Box*, moins marquée que pour DAF-16, pourrait indiquer des différences dans la reconnaissance de l'élément de réponse sur l'ADN. Toutefois, les acides aminés du domaine *Forkhead Box* interagissant avec l'ADN définis par l'analyse par la cristallographie aux rayons X de FoxP2 [Stroud et al, 2006] sont conservés chez SmFoxO. Cette conservation indique que SmFoxO lie une séquence correspondant à l'élément de réponse type des facteurs Fox 5'-RYMAAYA-3'(R=A ou G;Y=C ou T;M=A ou C) [Carlsson & Mahlapuu, 2002].

Par ailleurs, le site catalytique de SmSirt1 est très conservé et indiquerait une conservation de l'activité enzymatique protéine désacétylase. Toutefois, la présence d'une grande insertion au milieu du site pose la question de son effet sur cette activité. Nous avons

démontré la présence de l'insertion chez trois souches de *S. mansoni*, et l'absence de formes d'épissage alternatif sans l'insertion. Elle est donc présente dans la protéine native. Des insertions d'une taille moindre sont également présentes dans les orthologues chez la drosophile et chez *C. elegans*. En revanche, la présence d'un site consensus de phosphorylation par PKB/Akt dans l'insertion pourrait indiquer une régulation de l'activité par des modifications post-traductionnelles. L'effet de l'insertion sur l'activité enzymatique de SmSirt1 pourrait être étudié par la construction de mutants de délétion de tailles différentes, sans cette insertion. De plus, la présence dans cette insertion, d'un motif PEST [Rechsteiner & Rogers, 1996] pourrait indiquer une durée de vie de la protéine réduite par rapport aux homologues chez différentes espèces, à laquelle lui sera conférée une fonction différente. La présence de ce motif pourrait expliquer les difficultés que nous avons rencontrées pour détecter l'expression de la protéine dans des cellules transfectées (voir plus bas).

Nous avons également montré l'expression de leurs ARNm à tous les stades du cycle parasitaire, cependant la mise en évidence de leurs protéines est critique. En effet, les anticorps obtenus, qui ont prouvé leur efficacité en CHIP, sont inefficaces en western blot. De plus des expériences préliminaires d'immunolocalisation ont permis de mettre en évidence SmFoxO, mais pas SmSirt1, qui devront être répétées avec les anticorps obtenus de poules immunisées avec les peptides, et non plus de lapins. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence de localisation précise de SmFoxO chez les cercaires et somules, bien qu'il ait été retrouvé sur tout le parasite (voir Figure supplémentaire 1). Ces résultats ne sont pas surprenants si nous considérons les fonctions, *a priori*, multiples de FoxO et des ses orthologues. Chez le ver adulte mâle, la protéine est exprimée au niveau du tégument et principalement au niveau des spicules, tandis que chez la femelle, la concentration est davantage en périphérie de l'intestin. De façon à obtenir des informations plus précises sur la localisation protéique, nous voudrions réaliser de l'immunohistochimie sur coupe de parasite et non plus sur parasite entier.



Nos travaux ont également permis de montrer la capacité d'activation de la transcription de SmFoxO et la capacité de suractivation de la transcription de SmSirt1 en présence de SmFoxO. Afin de conforter nos résultats, nous avons réalisé un mutant N247A dans le domaine catalytique de SmSirt1. Bien que cette mutation semble diminuer la capacité de SmSirt1 à augmenter la transcription dépendante de FoxO1 de souris, elle n'a pas d'effet sur l'augmentation de la transcription dépendante de SmFoxO (non-montré dans l'article 3). Il est possible que l'activité enzymatique résiduelle de ce mutant (en effet, la mutation N247A n'abolit pas complètement l'activité enzymatique de Hst2 de la levure (homologue de Sir2) [Khan & Lewis, 2006]) soit suffisante pour augmenter l'activité transcriptionnelle faible de SmFoxO, mais n'aurait aucun effet sur l'activité déjà beaucoup plus importante de MmFoxO1. Par conséquent, afin de valider ou d'invalider ces hypothèses, nous proposons de réaliser un double mutant N247A et D395A, sachant que chaque mutation est efficace séparément chez Hst2 de levure [Khan & Lewis, 2006]. De plus il est nécessaire de mettre en évidence l'expression des protéines étudiées lors de nos transfections. Le problème rencontré lors des tentatives réside potentiellement dans un problème de quantité de protéines produites, puisque nous savons que le génome du schistosome, riche en A et T, induit un codon usage différent de celui des cellules mammifères dans lesquelles nous effectuons nos transfections. De plus dans le cas de SmSirt1, la mise en évidence d'un potentiel domaine PEST au niveau de l'insertion, pourrait rendre la protéine fortement

instable et dégradée extrêmement rapidement, ce qui empêcherait sa visualisation en western blot. D'ailleurs ce domaine est peut-être également à l'origine de nos soucis pour mesurer l'activité désacétylase de notre protéine. En effet, nous avons tenté d'obtenir la protéine entière par différents moyens, immunoprécipitation chez le parasite, expression en système bactérien, expression en lysat de réticulocytes, en cellules humaines, mais malgré le succès occasionnel de l'obtention de la protéine, son activité désacétylase n'a pu être mise en évidence. Afin de mettre en évidence l'expression de SmSirt1 ainsi que de son activité désacétylase, nous pouvons réaliser des protéines dépourvues soit de l'insertion dans le domaine catalytique, soit du domaine PEST uniquement.

La mise en évidence de l'aspect fonctionnel de SmFoxO passe dans un premier temps par sa capacité à transactiver la transcription, mais nous souhaitons également définir les éléments de réponse que la protéine reconnaît et auxquels elle se fixe afin d'activer la transcription. Par analogie nous avons identifié de potentiels gènes cibles de SmFoxO chez le parasite et grâce à la technique de ChIP nous avons pu montrer sa fixation au niveau des promoteurs des gènes codant SmIR1, SmIR2 et SmPEPCK. De même, comme nous savons que FoxO et Sirt1 interagissent chez d'autres espèces, nous avons réalisé du ChIP afin de montrer que SmSirt1 se fixe au niveau des mêmes promoteurs que SmFoxO. Afin d'obtenir des résultats plus précis, nous souhaitons poursuivre par du Re-ChIP, contre SmFoxO et contre SmSirt1 afin de mettre en évidence leur fixation simultanée au niveau de ces mêmes promoteurs. De plus il serait intéressant d'identifier de nouveaux gènes cibles de SmFoxO en clonant, à l'issue de ChIP, les séquences promotrices où se fixe la protéine.

Finalement, afin de rapporter notre étude au « paradoxe du schistosome » représenté par la coexistence d'une grande longévité, d'une fécondité élevée et d'un apport nutritionnel constant et élevé, nous souhaiterions étudier les effets de l'insuline sur des parasites en culture. Il serait intéressant d'étudier s'il existe une modification dans l'interaction entre SmSirt1 et SmFoxO au niveau des promoteurs de gènes cibles en présence ou en absence d'insuline, mais également une variation du niveau de la transcription des différents gènes cibles de SmFoxO au niveau desquels nos deux protéines interagissent.

DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES GENERALES

Conservation de la balance Acétylation/désacétylation des histones chez *Schistosoma mansoni*.

La régulation de l'expression génique ainsi que celle de la transcription des protéines sont des phénomènes extrêmement complexes, très fortement conservés à travers le règne du vivant. Cependant des spécificités propres à certaines espèces existent, des réseaux de régulation particuliers se sont développés et se sont adaptés au fil du temps. Un aspect essentiel de la régulation génique sur lequel nous avons décidé de focaliser notre attention au laboratoire est la balance acétylation/désacétylation d'histones. L'ajout d'un groupement acétyl, par des histones acétyl-tranfêrases, au niveau des queues des histones a pour principale fonction de décondenser la chromatine, ce qui active sa transcription. Tandis que leur désacétylation par des histones désacétylases, condense la chromatine ce qui tend à réprimer l'expression génique. Cette balance a prouvé son importance puisqu'une dérégulation au niveau de cet équilibre conduit généralement au développement de cancers. Que ce soit une sur-acétylation ou au contraire une sous-acétylation des histones, les effets varient selon les gènes. En effet, les HATs peuvent agir comme supprimeurs ou comme activateurs de tumeurs. Par exemple, la perte de l'acétylation globale de H4K16, associée à MOF, favorise à la tumorigénèse [Lee & Workman, 2007]. En revanche CBP et p300 sont considérés comme des supprimeurs de tumeurs, et leurs mutations entraînent divers cancers et maladies chez l'Homme (cancer colorectal, cancer du poumon, carcinome épithélial,...) [Giles et al, 1998 ; Gayther et al, 2000]. Par ailleurs, un recrutement aberrant et/ou la surexpression des HDACs sont caractéristiques de nombreux cancers comme des leucémies et des lymphomes [Bolden et al, 2006]. Ces modifications entraînent une altération de l'expression de 2 et 5% des gènes [Butler et al, 2002 ; Zheng et al, 2008], lesquels sont activement régulés par les HDACs. Dans les cellules cancéreuses, les HDACi fonctionnent en prévenant une répression génique anormale [Marks et Jiang, 2005]. La balance acétylation/désacétylation est basée sur un équilibre, qui lorsqu'il est déstabilisé, a de grandes conséquences. De plus, la dérégulation de l'expression des HDACs justifie l'utilisation des HDACi dans les thérapies contre les cancers. Les changements dans l'acétylation de l'histone H4 apparaissent tôt dans le processus tumorigène, indiquant que la restauration d'un état épigénétique « normal » pourrait être bénéfique.

Chez le schistosome, la découverte de l'existence de l'acétylation correspond à la mise en évidence de l'existence d'une HAT, GCN5 [de Moraes Maciel et al, 2004]. Ces résultats suggèrent la conservation de la balance acétylation/désacétylation des histones.

Par la suite, SmCBP1 et SmCBP2 ont découvertes [Bertin et al, 2006]. L'existence de la réaction inverse a été constatée grâce aux travaux effectués pendant ma thèse, au cours desquels nous nous sommes focalisés sur les HDACs de classe I et III, bien que des études *in silico* montrent l'existence de membres de la classe II [R. Pierce, données non publiées].

Les études réalisées sur les HATs de *S. mansoni* confirment l'existence d'une activité d'acétylation chez le parasite [de Moraes Maciel et al, 2004 ; Bertin et al, 2006]. SmGCN5, SmCBP1 et SmCBP2 possèdent les domaines conservés : HAT et bromodomaine. Le domaine HAT est responsable de l'activité acétyltransférase tandis que le bromodomaine est important pour l'interaction avec les lysines acétylées. Il a été démontré que SmGCN5 et SmCBP1 ont la capacité d'acétyler les histones *in vitro*, grâce à leur domaine HAT. SmGCN5 est globalement conservée cependant deux insertions ont été mises en évidence à chaque extrémités de la protéine (71AA en région aminoterminal et 66AA en région carboxyterminale). Les auteurs ne se sont pas penchés sur les conséquences que pourraient avoir ces insertions, bien que situées dans des régions non conservées de la protéine, leurs effets ne sont peut être que minimes. Actuellement aucune autre famille de HATs n'a été étudiée chez *S. mansoni*.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis l'identification de certaines enzymes membres de deux classes de HDACs. Toutefois, des études préliminaires permettent de confirmer une conservation plus générale des différentes classes de HDACs existantes, fortement conservées de la levure à l'Homme. En effet, parmi les quatre classes connues, trois sont retrouvées chez le schistosome. La classe I est constituée de trois membres, SmHDAC1, 3 et 8, contre quatre généralement chez les mammifères (HDAC1, 2, 3 et 8) [de Ruijter et al, 2003]. Des membres de la classe II ont pu être identifiés par des criblages dans les banques de données, leur clonage est actuellement en cours [S. Caby & R. Pierce, données non publiées]. HDAC6/10, 4 et 5 ont pu être identifiées, contre 6 membres chez l'Homme (HDAC4, 5, 6, 7, 9 et 10) [de Ruijter et al, 2003]. La seule HDAC de classe IV connue à l'heure actuelle, HDAC11, n'a pu être mise en évidence chez le schistosome, ni d'ailleurs chez aucune autre espèce non-mammifère [de Ruijter et al, 2003]. Concernant la classe III, les sirtuines, Sirt1 à 7 sont connues chez l'Homme [Blander & Guarente, 2004], tandis que chez *S. mansoni*, notre étude s'est focalisée sur Sirt1, des études *in silico* préliminaires permettent de montrer l'existence de quatre autres sirtuines. Les structures générales des quatre HDACs que nous avons étudiées, SmHDAC1, 3, 8 et SmSirt1, montrent une conservation globale de la structure avec cependant quelques spécificités. C'est le cas parmi les sirtuines où l'unique domaine conservé est le domaine catalytique. Pour SmSirt1, le domaine catalytique est présent et conservé, cependant il présente une insertion, ne correspondant pas à un exon et ne pouvant donc pas faire l'objet

d'un épissage alternatif. Nous avons pu retrouver cette insertion à travers différentes souches de *S. mansoni*.

Outre la conservation des acteurs de la désacétylation et de leur activité désacétylase *in vitro*, nous avons montré l'importance de ce mécanisme pour le parasite. En effet, la présence d'inhibiteurs de HDACs dans le milieu de culture parasitaire entraîne la mort des schistosomules et des vers adultes par apoptose. Nos résultats rejoignent ceux obtenus avec des lignées cellulaires tumorales où les HDACi induisent la mort cellulaire, laquelle présente les caractéristiques biochimiques et morphologiques de l'apoptose. Bien que les mécanismes mis en jeu pour provoquer cet effet restent à élucider complètement, il est établi que les HDACi induisent l'apoptose par les voies extrinsèques (*death receptor*) et/ou intrinsèques (mitochondriales) et, par ailleurs, induisent la différenciation associée avec l'arrêt du cycle cellulaire [Bolden et al, 2006]. De plus, ces effets semblent être sélectifs pour les cellules tumorales, dans la mesure où les doses nécessaires pour les induire chez ces dernières sont très inférieures aux doses toxiques pour les cellules normales [Bolden et al, 2006].

Azzi et al ont montré que le traitement de miracidia de *S. mansoni* par divers HDACi empêche leur transformation en sporocystes [Azzi et al, 2009]. Ces résultats, obtenus avec des concentrations de HDACi inférieures à celles que nous avons utilisées (et qui ont induit l'apoptose), semblent montrer que les effets sur le parasite n'impliquent pas l'induction d'une différenciation. Toutefois, il est possible que, dans ce cas, la prolifération cellulaire, inhibée par des doses relativement faibles de HDACi, représente une étape initiale de la transformation. La nécessité de doses relativement élevées d'HDACi (2 à 10 μ M pour la TSA) pour induire l'apoptose chez les schistosomules *in vitro* pourrait être en relation avec une faible diffusion des drogues à travers la double membrane entourant les larves. Le développement de nouveaux agents chimiothérapeutiques doit tenir compte de ce paramètre.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'équilibre des mécanismes d'acétylation et de désacétylation chez le parasite joue un rôle fondamental dans son cycle de vie et dans sa survie. De plus, le potentiel des HDACi comme agents chimiothérapeutiques contre les schistosomes est clairement démontré.

Sirt1, FoxO et la longévité chez *Schistosoma mansoni*.

Chez la majorité des organismes modèles, allant de la levure à l'Homme, la voie de signalisation dépendante du récepteur à l'insuline/IGF est centrale aux mécanismes déterminant la longévité, en lien direct avec la fécondité. En effet, la stimulation de cette voie entraîne une baisse de la fécondité et une diminution de la durée de vie, tandis que son

inhibition favorise la survie ainsi que la reproduction [Bordone & Guarente, 2005 ; Tissenbaum & Guarente, 2002]. Des observations contradictoires chez *S. mansoni* nous ont amené à nous intéresser à ce que nous avons nommé « le paradoxe du schistosome » où, *a priori*, les vers adultes ne subissent aucune restriction calorique, vivent pendant plus de trente ans et ont une capacité de reproduction élevée.

Au cours de nos travaux, certes préliminaires, nous avons mis en évidence l'existence des orthologues de deux protéines clés aux mécanismes régulant la longévité, Sirtuine 1 et FoxO. Nous avons ainsi confirmé leur identité, étudié leur implication dans la régulation de la transcription et entamé la mise en évidence de leur interaction.

Afin de tenter d'expliquer ce paradoxe, nous avons réalisé des études bibliographiques et *in silico*, afin d'identifier les différents acteurs de la voie de signalisation de l'insuline chez le schistosome. Sachant que chez *S. mansoni*, l'insuline humaine module la prise du glucose [Ahier et al, 2008].

La première étape de cette voie est le récepteur à l'insuline. Son existence a été mis en évidence par Khayath et al, en 2007. Ils ont ainsi caractérisé 2 homologues, pour la première fois chez un invertébré, SmIR1 et SmIR2, ayant des particularités de structure, des différences d'expression et de localisation, qui laisseraient penser qu'ils exerceraient des fonctions légèrement différentes. Bien que tous deux lient la pro-insuline humaine, SmIR1 est localisé au niveau du tégument, des muscles et de l'épithélium intestinal, ce qui suggérerait un rôle plus important dans la régulation de la prise de glucose que SmIR2, localisé au niveau du parenchyme des vers adultes [Khayath et al, 2007].

Suite à la fixation de l'insuline sur son récepteur, l'activation de l'*Insuline Receptor Substrate-1* (IRS-1) se met en place (**Figure 29**). Aucune étude chez le schistosome ne porte sur cette protéine, le criblage dans les banques de données que nous avons effectué n'a pas permis d'identifier de potentielle protéine orthologue. C'est le seul maillon de la chaîne manquant dans la voie de signalisation de l'insuline chez le parasite. Il a été démontré chez la souris qu'en l'absence d'IRS-1, une augmentation de la durée de vie est mesurée [Selman et al, 2008]. Toutefois, IRS-1 n'est pas nécessaire à l'activation de la voie de signalisation insulino-dépendante, et plus particulièrement à l'activation de la phosphatidyl-3-kinase (PI3K) [Hirsch et al, 2007]. Les voies de signalisation dépendantes de récepteurs tyrosine kinases impliquent des PI3K de classe IA et l'activation du domaine catalytique est déterminée par l'interaction de la sous-unité adaptatrice/régulatrice de 85 kDa avec le domaine kinase (110 kDa) du récepteur. Cette activation peut se passer avec ou sans IRS-1. Un criblage du génome de *S. mansoni* [R. Pierce, résultats non publiés] a indiqué la présence de plusieurs gènes potentiellement codant des sous-unités catalytiques et des sous-unités adaptatrices/régulatrices. Une étude récente, plus approfondie [Bahia et al, 2009] a identifié des PI3K (domaines catalytiques) des trois classes principales [Hirsch et

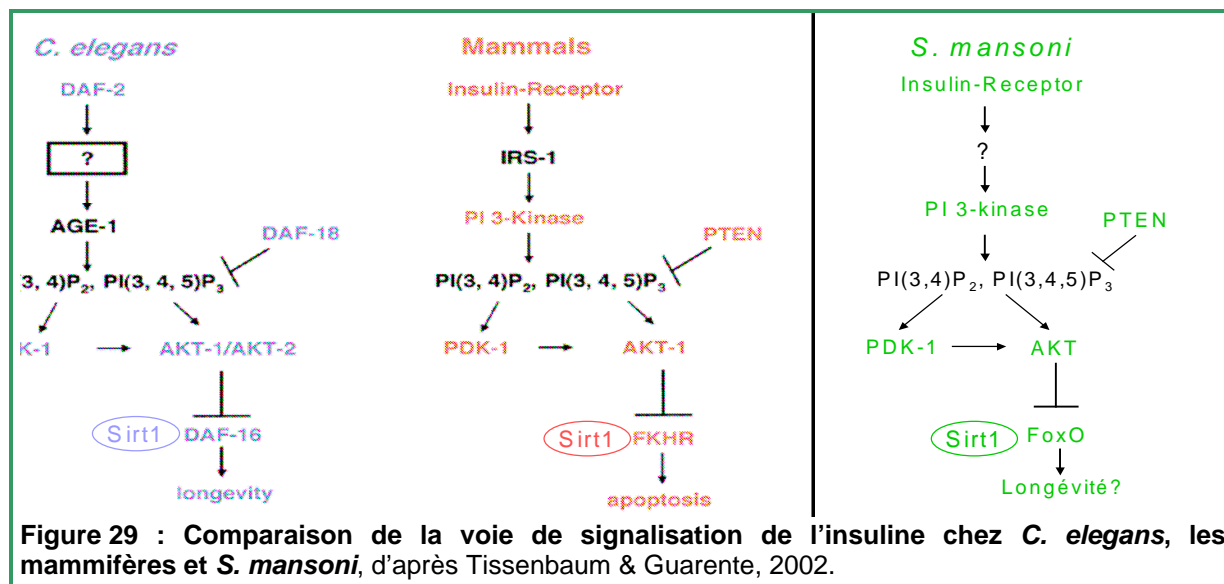
al, 2007] mais n'a pas permis d'attribuer la PI3K de classe I à l'une ou l'autre des sous-classes A et B.

En revanche, ni la Pyruvate Déshydrogénase Kinase 1 (PDK1) ni la protéine kinase Akt n'ont été étudiées chez le schistosome, cependant le criblage *in silico* a permis de mettre en évidence l'existence d'un orthologue pour chacune de ces protéines. De même, le suppresseur tumoral PTEN, qui oppose les effets de la PI3K et qui bloque ainsi la voie de signalisation (**Figure 29**), est également présent dans le génome de *S. mansoni*.

Finalement le facteur de transcription FoxO existe chez le parasite et semble pouvoir être phosphorylé par Akt (conservation de 2 sites potentiels). Il régule la transcription de nombreux gènes cibles impliqués dans diverses fonctions essentielles pour la cellule, telles que le métabolisme du glucose, la défense anti-oxydante, le cycle cellulaire ou encore l'apoptose. FoxO n'est pas uniquement l'étape finale de la voie de signalisation dépendante de l'insuline, il intervient dans diverses autres voies de signalisation, telles que la voie JNK. Son interaction avec Sirt1 est essentielle pour sa régulation et son maintien au niveau des promoteurs cibles.

Nous savons que l'insuline humaine favorise la fixation du glucose chez *S. mansoni* et que la voie de signalisation en aval de ce récepteur semble être conservée. Cependant, il pourrait exister un biais puisque la richesse en glucose dans le milieu extérieur du parasite ne coïncide pas avec son extrême longévité et la ponte élevée de la femelle. Pour vérifier une possible dissociation entre la voie de signalisation dépendante de l'insuline et SmFoxO/SmSirt1, il serait intéressant de cultiver les parasites en présence d'insuline humaine et d'étudier les effets sur SmFoxO, SmSirt1 et la régulation des gènes cibles, à savoir si les conséquences sont identiques à celles observées chez les autres organismes ou non. En effet, il s'agit de déterminer si le traitement de larves ou de vers adultes en culture avec l'insuline a pour effet l'éjection de SmFoxO du noyau cellulaire, que nous pouvons déterminer par immunofluorescence ou par ChIP. Une récente étude montre les effets sur la transcription de gènes (par microarray) lors de traitements par l'insuline humaine de vers adultes désappariés de *S. japonicum* [You et al, 2009]. Les résultats ne prennent en compte que les gènes dont l'expression varie d'un facteur d'au moins 1,5 fois. Il ressort de cette étude, dans un premier temps, que les effets de l'insuline sur l'expression des gènes varient selon le sexe des parasites. Chez le ver mâle, les auteurs observent une surexpression des gènes associés à la transcription et à la traduction, suggérant une augmentation des quantités d'ARNm et de protéines dans les parasites, résultats similaires à ceux obtenus chez les mammifères. La deuxième observation réalisée est que l'insuline semble jouer un rôle plus important pour l'absorption du glucose chez les vers mâles que chez les vers femelles, qui consomment la même quantité de glucose en présence ou en absence d'insuline. Ces résultats suggèrent donc que l'insuline semblerait être importante

dans la croissance parasitaire, *via* la voie de signalisation impliquant la PI3K, mais également dans la différenciation sexuelle et la fécondité des vers adultes femelles, *via* la voie de signalisation des MAPKs. Dans notre cas une étude similaire serait intéressante afin d'étudier la variation d'expression des gènes cibles de SmFoxO, mais d'autres études au niveau protéique seraient également essentielles.



Histones déacetylases et autres enzymes modifiant les histones comme cibles anti-schistosomiales ?

Les HDACs mais également toutes les autres enzymes responsables des modifications des histones sont essentielles. Lorsqu'elles sont dérégulées ou mutées, bien souvent elles engendrent le développement de cancers. C'est pourquoi elles font l'objet de criblages afin de développer des inhibiteurs spécifiques. Que ce soit dans le cas de cancers [Bolden et al, 2006], mais également d'autres maladies comme des maladies parasitaires [Ouaissi & Ouaissi, 2006], la spécificité de certains inhibiteurs a été démontrée. Le criblage d'une série de composés, dérivés de l'acide hydroxamique, a récemment permis l'identification de candidats montrant une spécificité pour les HDACs de *Plasmodium* [Agbor-Enoh et al, 2009]. Ces composés montrent une toxicité jusqu'à 950 fois supérieure contre *P. falciparum* par rapport aux cellules HeLa et sont efficaces contre une infection par *P. berghei* chez la souris. Il semble donc tout à fait possible d'envisager le développement de médicaments anti-schistosomiaux spécifiques ciblant d'autres enzymes modifiant les histones. Comme nous avons pu le montrer pour les HDACs, cette famille d'enzymes semble globalement conservée, mais lorsqu'on se focalise sur certains de ses membres, des spécificités peuvent être mises en évidence.

Dans ce contexte SmHDAC8 nous paraît particulièrement prometteur. Nos travaux sont les premiers à décrire cette isoforme en dehors des vertébrés. Bien qu'il s'agisse d'une HDAC de classe I, HDAC8 montre plusieurs différences par rapport aux autres membres de cette classe. En plus du site de liaison de l'ion Zn^{2+} (qui peut également lier l'ion Fe^{2+}), elle possède deux sites pour des liaisons d'ions K^+ [Vannini et al, 2004]. Son activité catalytique est régulée négativement par phosphorylation par la PKA [Lee et al, 2004]. Des expériences d'inactivation de HDAC8 montrent qu'elle est essentielle à la survie de trois lignées cellulaires tumorales [Vannini et al, 2004]. Cette protéine semble plus facile à étudier que les autres HDACs de classe I car elle est active seule [Hu et al, 2000]. Il est également possible de développer des inhibiteurs spécifiques pour HDAC8 avec une sélectivité de plus de 200 fois par rapport aux autres isoformes [Balasubramanian et al, 2008]. L'un de ces inhibiteurs, PCI-34051, induit l'apoptose dans des lignées cellulaires dérivées de lymphomes à cellules T, mais ne provoque pas une hyperacétylation globale des histones, soulignant la spécificité de son action.

Bien que la structure cristallographique de l'HDAC8 humaine soit résolue [Vannini et al, 2004 ; Somoza et al, 2004], la cristallisation de SmHDAC8 apporterait de précieuses données quant à l'organisation des insertions de son domaine catalytique. Toutefois, bien que nous ne connaissions pas actuellement l'effet de ces insertions sur l'activité enzymatique, une modélisation récente du domaine catalytique [W. Sippl, communication personnelle, Université de Halle, Allemagne] montre que deux résidus (Gly99 et Met274 chez l'HDAC8 de souris, qui sont identiques chez l'Homme), en contact avec les inhibiteurs SAHA et TSA, sont substitués chez SmHDAC8 (par Tyr et His), indiquant un changement important dans les capacités de liaison de ces inhibiteurs par cette dernière. Ces données soulignent l'intérêt potentiel et la possibilité de développement d'inhibiteurs spécifiques pour SmHDAC8.

Dans ce contexte, une autre histone déacetylase de *S. mansoni* a attiré notre attention, SmSirt1. Comme SmHDAC8 elle possède un domaine catalytique fortement modifié par rapport aux orthologues chez les mammifères, notamment par une grande insertion de fonction inconnue mais qui renferme des motifs régulateurs potentiels (site de phosphorylation par PKB/Akt, motif PEST). Les sirtuines ont été moins étudiées comme cibles thérapeutiques jusqu'à présent. Pourtant, la Sirt1 de mammifères est un régulateur clé de la survie cellulaire face aux stress qui, en son absence, provoquent l'apoptose *via* l'activation de la p53 [Ford et al, 2005]. La protéine p53, un suppresseur de tumeurs, est activée et acétylée en réponse à divers types de stress. Sirt1 peut désacétyler p53 et ainsi réduire l'induction de l'apoptose [Luo et al, 2001]. Il n'y a que peu de données concernant l'inhibition des sirtuines et un nombre limité d'inhibiteurs est disponible. Le premier décrit a été le sirtinol, mais son activité *in vitro* pourrait seulement être due à une

précipitation de l'enzyme. Un indole, le cambinol est efficace dans un modèle animal [Heltweg et al, 2006] et plus récemment, des dérivés des splitomycines ont été développés avec des propriétés anti-prolifératives sur une lignée cellulaire dérivée d'un cancer du sein [Neugebauer et al, 2008]. Par ailleurs, des thiobarbiturates ont été décrits comme une nouvelle classe d'inhibiteur des sirtuines [Uciechowska et al, 2008].

En ce qui concerne les parasites protozoaires, Sir2 de *P. falciparum* est inhibée par le nicotinamide, un produit de la réaction catalysée par l'enzyme, mais au cours d'études préliminaires, elle s'est montrée insensible au sirtinol ou à la splitomycine [Merrick et Duraisingh, 2007]. Toutefois des études plus récentes montrent que le nicotinamide et l'inhibiteur synthétique, la surfactine, inhibent tous deux PfSir2 et sont des inhibiteurs puissants de la croissance intra-érythrocytaire du parasite [Prusty et al, 2008 ; Chakrabarty et al, 2008]. Par ailleurs, le sirtinol inhibe *in vitro* la croissance de *Leishmania infantum in vitro* via l'induction de l'apoptose [Vergnes et al, 2005]. Les sirtuines, en particulier SmSirt1, sont donc des cibles légitimes pour le développement de nouveaux agents chimiothérapeutiques.

Un projet pour le développement de nouvelles classes d'agents thérapeutiques contre les schistosomes...

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse a permis de démontrer le potentiel des HDACs et des sirtuines comme cibles de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les schistosomes. Ils ont également permis la mise en place d'un projet, nommé SETReND, financé par la CE et impliquant 9 équipes dans 3 pays Européens ainsi qu'au Brésil, visant le développement de nouveaux agents chimiothérapeutiques. Ce projet se focalisera initialement sur SmHDAC8 et SmSirt1, mais la stratégie globale impliquera également :

- L'utilisation de la bioinformatique et le clonage moléculaire pour identifier toutes les enzymes de *S. mansoni* impliquées dans les processus d'acétylation, désacétylation, méthylation et déméthylation.
- Le choix de candidats prometteurs (basé sur leurs particularités au niveau du domaine catalytique) par modélisation *in silico*.
- Le criblage de ces candidats à moyen et haut débit pour identifier des inhibiteurs spécifiques.
- L'utilisation de RNAi pour valider ces candidats comme cibles.
- L'étude des effets des inhibiteurs sur le parasite *in vitro* et *in vivo*.

Ce projet devrait permettre de générer des composés-candidats (*lead compounds*) actifs *in vitro* et *in vivo* contre le parasite et qui permettront le développement de dérivés représentant de nouvelles classes d'agents anti-schistosomiaux. Ces agents seront indispensables pour

la lutte future contre la schistosomiase qui reste à l'heure actuelle un problème de santé mondiale majeur.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Adoutte A., Balavoine G., Lartillot N., Lespinet O., Prud'homme B. and de Rosa R. (2000). The New Animal Phylogeny: Reliability and Implications. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 97(9): 4453-4456.
- Agbor-Enoh S., Seudieu C., Davidson E., Dritschilo A. and Jung M. (2009). Novel Inhibitor of *Plasmodium* Histone Deacetylase that Cures *P. berghei*-Infected Mice. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 53:1727-17234.
- Aguinaldo A.M., Turbeville J.M., Linford L.S., Rivera M.C., Garey J.R., Raff R.A. and Lake J.A. (1997). Evidence for a Clade of Nematodes, Arthropods and Other Moulting Animals. Nature, 387(6632): 489-493.
- Ahamd K. and Henikoff S. (2001), Centromeres are Specialized Replication Domains Interchromatin. Journal of Cell Biology 153(1): 101-9.
- Ahier A., Khayath N., Vicogne J. and Dissous C. (2008). Insulin receptors and glucose uptake in the human parasite *Schistosoma mansoni*. Parasite 15(4):573-9.
- Ahmad K. and Henikoff S. (2002), The Histone Variants H3.3 Marks Active Chromatin by Replication-independent Nucleosome assembly. Molecular Cell 9(6): 1191-200.
- Ahringer J. (2000), NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. Trends in Genetics 16(8): 351-6.
- Ahuja N., Schwer B, Carobbio S., Waltregny D., North B.J., Castronovo V., Maechler P. and Verdin E. (2007). Regulation of Insulin Secretion by Sirt4, a Mitochondrial ADP-Ribosyltransferase. Journal of Biological Chemistry 282(46): 33583-92.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. (2002), Molecular Biology of the Cell, 4th Edition, Garland Science.
- Allfrey V.G., Faulkner R. and Mirsky A.E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 51: 786-94.
- Andäng M, Hjerling-Leffler J., Moliner A., Lundgren T.K., Castelo-Branco G., Nanou E., Pozas E., Bryia V., Halliez S., Nishimaru H., Wiltzberg J., Arenas E., Koltzenburg M., Charnay P., El Manira A., Ibanez C.F. and Ernfors P. (2008). Histone H2AX-dependent GABA_A Receptor of Stem Cell Proliferation. Nature 451(7177): 460-5.
- Andrews K.T., Walduck, A., Kelso M.J., Fairlie D.P., Saul A. and Parsons P.G. (2000). Anti-malarial Effect of HDACi and Mammalian Tumor Cytodifferentiation Agents. International Journal of Parasitology 30 : 761-8.
- Azzi A., Cosseau C. and Grunau C. (2009). *Schistosoma mansoni* : Developmental Arrest of Miracidia Treated with HDAC Inhibitors. Experimental Parasitology 121 : 288-91.

B

- Bahia D., Oliveira L.M., Mortara R.A. and Ruiz J.C. (2009). Phosphatidylinositol- and Related-Kinases : A Genome-Wide Survey of Classes and Subtypes in The *Schistosoma mansoni* Genome for Designing Subtype- Specific Inhibitors. Biochemical and Biophysical Research Communications 390 : 525-30.

- Balavoine G., de Rosa R. and Adoutte A. (2002). Hox Clusters and Bilaterian Phylogeny. *Molecular and Phylogenetic Evolution* 24(3): 366-73.
- Balasubramanian S., Ramos J., Luo W., Verner E. and Buggy J.J. (2008). A Novel Histone Deacetylase 8 (HDAC8)-Specific Inhibitor PCI-34051 Induces Apoptosis in T-cell Lymphomas. *Leukemia* 22:1026-1034.
- Balasubramanian S., Verner E. and Buggy J.J. (2009). Isoform Specific Histone Deacetylase Inhibitor : the Next Step ? *Cancer Letters* 280(2): 211-21.
- Bannister A.J. and Kouzarides T. (2005). Reversing Histone Methylation. *Nature*, 436(7054): 1103-6.
- Bao Y. and Sen X. (2007). INO80 Subfamily of Chromatin Remodelling Complexes. *Mutation Research* 618(1-2): 18-29.
- Berger S.L. (2002). Histone Modifications in Transcriptional Regulation. *Current Opinion in Genetics Development* 12(2): 142-8.
- Berndsen C.E. and Denu J.M. (2008). Catalysis and Substrate Selection by Histone/Protein Lysine Acetyl Transferase. *Current Opinion in Structural Biology* 18(6): 682-9.
- Berriman M., Haas B.J., LoVerde P.T., Wilson R.A., Dillon G.P., Cerqueira G.C., Mashiyama S.T., Al-Lazikani B., Andrade L.F., Ashton P.D., Aslett M.A., Bartholomeu D.C., Blandin G., Caffrey C.R., Coghlan A., Coulson R., Day T.A., Delcher A., DeMarco R., Djikeng A., Eyre T., Gamble J.A., Ghedin E., Gu Y., Hertz-Fowler C., Hirai H., Hirai Y., Houston R., Ivens A., Johnston D.A., Lacerda D., Macedo C.D., McVeigh P., Ning Z., Oliveira G., Overington J.P., Parkhill J., Perlea M., Pierce R.J., Protasio A.V., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Sajid M., Salzberg S.L., Stanke M., Tivey A.R., White O., Williams D.L., Wortman J., Wu W., Zamanian M., Zerlotini A., Fraser-Liggett C.M., Barrell B.G., El-Sayed N.M. (2009). The Genome of the Blood Fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 460(7253): 352-8.
- Bertin B., Sasorith S., Caby S., Oger F., Cornette J., Wurtz J.M. and Pierce R.J. (2004). Unique Functional Properties of a Member of the Fushi Tarazu-Factor 1 Family from *Schistosoma mansoni*. *Biochemical Journal*, 382(Pt 1): 337-51.
- Bertin B., Caby S., Oger F., Sasorith S., Wurtz J.M. and Pierce R.J. (2005). The Monomeric Orphan Nuclear Receptor *Schistosoma mansoni* Ftz-F1 Dimerizes Specifically and Functionally with the Schistosome RXR Homologue, SmRXR1. *Biochemistry and Biophysics Research Communication* 327(4): 1072-82.
- Bertin B., Oger F., Cornette, J., Caby, S., Noel, C., Capron, M., Fantappi , M.R., Rumjanek, F.D. and Pierce, R.J. (2006). *Schistosoma mansoni* CBP/p300 has a Conserved Domain Structure and Interacts Functionally with the Nuclear Receptor SmFtz-F1. *Molecular Biochemical Parasitology* 146(2): 180-91.
- Blander G. and Guarente L. (2004). The Sir2 Family of Protein Deacetylases. *Annual Review of Biochemistry* 73 : 417-35.
- Bolden J.E., Peart M.J. and Johnstone R.W. (2006). Anticancer Activities of Histone Deacetylase Inhibitors. *Nature Reviews in Drug Discovery* 5(9): 769-84.
- Bordone L. and Guarente L. (2005). Calorie Restriction, Sirt1 and Metabolism : Understanding Longevity. *Nature Reviews in Molecular Cell and Biology* 6(4): 298-305.
- Bordone L., Motta M.C., Picard F., Robinson A., Jhala U.S., Apfeld J., Mc Donagh T., Lemieux M., Mc Burney M., Szilvasi I., Ealson E.J., Lin S.J. and Guarente L. (2006). SIRT1 Regulated Insulin Secretion, Repressing UCP2 in Pancreatic Beta Cells. *PloS biology* 4(2): 210-20.
- Braunstein M., Rose A.B., Homles S.G., Allis C.D. and Broach J.R. (1993). Transcriptional Silencing in Yeast is Associated with Reduced Nucleosome Acetylation. *Genes and Development* 7(4): 592-604.

Brehm A., Langst G., Kehle J., Clapier C.R., Inhof A., Eberharter A., Muller J. and Becker P. (2000). DMI2 and ISWI Chromatin Remodelling Factors have Distinct Nucleosome Binding and Mobilization Properties. *EMBO Journal* 19(16): 4332-41.

Brickner D.G., Cajigas I., Fondufe-Mittendorf Y., Ahmed S., Lee P.C., Widom J. and Brickner J.H. (2007). H2A.Z-mediated Localization of genes at the Nuclear Periphery Confers Epigenetic Memory of Previous Transcriptional State. *PLoS Biology* 5(4): 704-16.

Brunet A., Sweeney L.B., Sturgill J.F., Chua K.F., Greer P.L., Lin Y., Trans H., Ross S.E., Alt F.W. and Greenberg M.E. (2004). Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase. *Science* 303(5666): 201-5.

Bueding E. (1950). Carbohydrate Metabolism of *Schistosoma mansoni*. *Journal of General Physiology* 33(5): 475-95.

Buggy J.J., Sideris M.L., Male P., Lorimer D.D., Mc Instosh B. and Clark J.M. (2000). Cloning and Characterization of a Novel Human Histone Deacetylase, HDAC8. *Biochemical Journal*, 350(): 199-205.

Butler L.M., Zhou X., Xu W.S., Scher H.I., Rifkind R.A., Marks P.A. and Richon V.M. The Histone Deacetylase Inhibitor SAHA Arrests Cancer Cell Growth, Up-Regulates Thioredoxin-Binding Protein-2, and Down-Regulates Thioredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:11700-11705.



Caby S., Pierce R.J. (2009) Quantitative Chromatin Immunoprecipitation (Q-ChIP) Applied to *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 166(1):77-80.

Canto C. and Auwerx J. (2009). Caloric Restriction, SIRT1 and Longevity. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 20(7): 325-31.

Capron A., Riveau G., Capron M. and Trottein F. (2005). Schistosomes: the Road from Host-Parasite Interactions to Vaccines in Clinical Trials. *TRENDS in Parasitology* 21(3): 143-9.

Carrozza M.J., Utley R.T., Workman J.L. and Cote J. (2003). The Diverse Functions of Histone Acetyltransferase Complexes. *TRENDS in Genetics*, 19(6): 321-9.

Chabasse D., Bertrand G., Leroux J.P., Gauthey N. and Hocquet P. (1985). Developmental Bilharziasis caused by *Schistosoma mansoni* Discovered 37 years after Infestation. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales* 78(5) : 643-7.

Chadwick B.P. and Willard H.F. (2001). A novel Chromatin Protein, Distantly Related to Histone H2A, is Largely Excluded from the Inactive X Chromosome. *Journal of Cell Biology*, 152(2): 375-84.

Chadwick B.P. and Willard H.F. (2001). Histone H2A Variants and the Inactive X Chromosome : Identification of a Second macroH2A Variant. *Human Molecular Genetics* 10(10): 1101-13.

Chakrabarty S.P., Saikumari Y.K., Bopanna M.P. and Balaram H. (2008). Biochemical Characterization of *Plasmodium falciparum* Sir2, a NAD⁺-dependent Deacetylase. *Molecular and Biochemical Parasitology* 158(2):139-51

Chan H.M. and La Thangue N.B. (2001). p300/CBP Proteins: HATs for Transcriptional Bridges and Scaffolds. *Journal of Cell Science* 114(Pt 13): 2363-73.

Chandler V.L. and Stam M. (2004). Chromatin Conversations: Mechanisms and Implications of Paramutation. *Nature Reviews in Genetics* 5(7): 532-44

- Chawla S., Vanhotte P., Arnold F.J., Huang C.L. and Bading H. (2003). Neuronal Activity-Dependent Nucleocytoplasmic Shuttling of HDAC4 and HDAC5. *Journal of Neurochemistry* 85(1):151-9.
- Cheng H.L., Mostoslavsky R., Saito S., Maris J.P., Gu Y., Patel P., Bronson R., Appella E., Alt F.W. and Chua K.F. (2003). Developmental Defects and p53 Hyperacetylation in Sir2 Homolog (SIRT1)-Deficient Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 100 : 10794-99.
- Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A. and Savioli, L. (2000). The Global Status of Schistosomiasis. *Acta Topica*, 77 : 41-51.
- Colot V. and Rossignol J.L. (1999). Eukaryotic DNA Methylation as an Evolutionary Device. *Bioessays* 21(5):402-11.
- Corona D.F., Clapier C.R., Becker P.B. and Tamkun J.B. (2002). Modulation of ISWI Function by Site-Specific Histone Acetylation. *EMBO Reports* 3 : 242-7.
- Cosseau C., Azzi A., Smith K., Freitag M., Mitta G. and Grunau C. (2009). Native Chromatin Immunoprecipitation (N-ChIP) and ChIP-Seq of *Schistosoma mansoni* : Critical Experimental Parameters. *Molecular and Biochemical Parasitology* 166(1):70-6.
- Costanzi C. and Pehrson J.R. (1998). Histone Macro H2A.1 is Concentrated in the Inactive X Chromosome of Female Mammals. *Nature*, 393(6685): 599-601.
- Cunliffe V.T. (2008). Eloquent Silence : Developmental Functions of Class I HDAC. *Current Opinion in Genetics and Development*, 18(5): 404-10.



- Daitoku H., Matta M., Matsuzaki H., Aratani S., Oshima T., Miyagashi M., Nakajima T. and Fukamizu A. (2004). Silent Information Regulator 2 Potentiates FoxO1-Mediated Transcription Through its Deacetylase Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(27): 10042-7.
- de Moraes Maciel R., de Silva Dutra D.L., Rumjanek F.D., Juliano L., Juliano M.A. and Fantappié M.R. (2004). *Schistosoma mansoni* histone acetyltransferase GCN5 : Linking Histone Acetylation to Gene Activation. *Molecular Biochemistry Parasitology* 133(1): 131-5.
- de Moraes Maciel R., da Costa R.F., de Oliveira F.M., Rumjanek F.D. and Fantappié M.R. (2008). Protein Acetylation sites mediated by *Schistosoma mansoni* GCN5. *Biochemical and Biophysical Research Community* 370(1): 53-6.
- de Rosa R., Grenier, J.K., Andreeva T., Cook C.E., Adoutte A., Akam M., Carroll S.B. and Balavoine G. (1999). Hox genes in brachiopods and Priapulids and Protostome Evolution. *Nature* 399(6738): 772-6.
- De Ruijter A.J.M., van Gennip A.H., Caran H.N., Kemps S. and van Kuilenburg A.B.P. (2003). Histone Deacetylases : Characterization of the Classical HDAC Family. *Biochemical Journal* 370(): 737-49.
- Dhalluin C., Carlson J.E., Zeng L., He C., Aggarwal A.K. and Zhou M.M. (1999). Structure and Ligand of a Histone Acetyltransferase Bromodomain. *Nature* 399(6735): 491-6.
- Doenhoff M.J., Hassounah O., Murare H., Bain J. and Lucas S. (1986). The Schistosomula Egg Granuloma : Immunopathology in the Cause of the Host Protection or Parasite Survival? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80(4): 503-14.



- Fallon P.G. and Doenhoff M.J. (1994). Drug-Resistant Schistosomiasis: Resistance to Praziquantel and Oxamniquine Induced in *Schistosoma mansoni* in Mice is Drug Specific. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51(1):83-8.
- Fantappiè M.R., Gimba E.R. and Rumjanek F.D. (2001). Lack of DNA Methylation in *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology* 98(3): 162-6.
- Feinberg A.P. (2007). Phenotypic Plasticity and the Epigenetics of Human Disease. *Nature* 447(7143) : 433-40.
- Fenwick A., Savioli L., Engels D., Bergquist N.R. and Tod M.H. (2003). Drugs for the Control of Parasitic Diseases : Current Status and Development in Schistosomiasis. *TRENDS in Parasitology* 19(11): 509-16.
- Fesenfeld G. and Groudine M. (2003). Controlling the Double helix. *Nature* 421(23): 448-53.
- Finnin M.S., Donigian J.R., Cohen A., Richon V.M., Rifkind R.A., Marks P.A., Breslow R. and Pavletich N. P. (1999). Structures of a Histone Deacetylase Homologue Bound to the TSA and SAHA Inhibitors. *Nature* 401(6749): 188-93.
- Ford E., Voit R., Liszt G., Magin C., Grummt I. and Guarente L. (2006). Mammalian Sir2 Homolog SIRT7 is an Activator of RNA Polymerase I transcription. *Genes and Development* 20(9): 1075-80.
- Ford J., Jiang M. and Milner J.(2005). Cancer-Specific Functions of SIRT1 Enable Human Epithelial Cancer Cell Growth and Survival. *Cancer Research* 65:10457-10463.



- Galasinski S.C., Resing K.A., Goodrich J.A. and Ahn N.G. (2002). Phosphatase Inhibition Leads to Histone Deacetylases 1 and 2 Phosphorylation and Disruption of Corepressor Interactions. *Journal of Biological Chemistry* 277(22): 19618-26.
- Gao L., Cueto M.A., Asselbergs F. and Atadja P. (2002). Cloning and Functional Characterization of HDAC11, a Novel Member of the Human Histone Deacetylase Family. *Journal of Biological Chemistry* 277(28): 25748-55.
- Gaythers S.A., Batley S.J., Linger L., Bannister A., Thorpe K., Chin S.F., Gaigo Y., Russell P., Wilson A., Sowter H.M., Delhanty J.D., Ponder B.A., Kouzarides T. and Caldas C. (2000). Mutation Truncating the EP300 Acetylase in Human Cancers. *Nature Genetics* 24(3): 300-3.
- Giles R.H., Peters D.J. and Breuning M.H. (1998). Conjunction Dysfunction : CBP/p300 in Human Diseases. *Trends in Genetics* 14(5): 178-83.
- Goll M.G., Kipeker F., Maggaert K.A., Yoder J.A., Hsieh C.L., Zhang X., Golic K.G., Jacobsen S.E. and Bestor T.H. (2006). Methylation of tRNA by the DNA Methyltransferase Homologue Dnmt2. *Science* 311(5759): 395-8.
- Greenberg R.M. (2005). Ca²⁺ Signalling , Voltage-Gated Ca²⁺ Channels and Praziquantel in Flatworm Neuromusculature. *Parasitology* 131 suppl : S97-108.
- Greer E.L. and Brunet A. (2005). FOXO Transcription Factors at the Interface Between Longevity and Tumor Suppression. *Oncogene* 24(50): 7410-25.
- Gregorette I.V., Lee Y.M. and Goodson H.V. (2004). Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family : Functional Implications of Phylogenetic Analysis. *Journal of Molecular Biology*, 338(1): 17-31.

Grozinger C.M., Chao E.D., Blackwell H.E., Moazed D. and Schreiber S.L. (2001). Identification of a Class of Small Molecule Inhibitors of the Sirtuin Family of NAD-Dependent Deacetylases by Phenotypic Screening. *Journal of Biological Chemistry* 276(42):38837-43.

Grubisha O., Smith B.C. and Denu J.M. (2005). Small Molecule Regulation of Sir2 Protein Deacetylases. *FEBS Journal* 272(18):4607-16.

Gryseels B., Polman K., Clerinx J. and Kestens L. (2006). Human Schistosomiasis. *Lancet* 368(9541): 1106-18.

Guardiola A.R. and Yao T.P. (2002). Molecular Cloning and Characterization of a Novel Histone Deacetylase HDAC10. *Journal of Biological Chemistry* 277(5): 3350-6.

Guarente L. (2005). Calorie Restriction and Sir2 genes : Towards a Mechanism. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(9): 923-8.

H

Haigis M.C. and Guarente L. (2006). Mammalian Sirtuins : Emerging Roles in Physiology, Aging and Calorie Restriction. *Genes and Development* 20(21): 2913-21.

Hannenhalli S. and Kaestner K.H. (2009). The Evolution of Fox Genes and their Role in Development and Disease. *Nature Reviews in Genetics* 10(4):233-40.

Hassa P.O., Haenni S.S., Elser M. and Hottiger M.O. (2006). Nuclear ADP-Ribosylation Reactions in Mammalian Cells: Where Are We Today and Where Are We Going? *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(3): 789-829.

Hassan Y. I. and Zemleni J. (2006). Epigenetic Regulation of Chromatin Structure and Gene Function by Biotin. *The Journal of Nutrition* 136(7): 1763-5.

Heltweg B., Gatbonton T., Schuler A.D., Posakony J., Li H., Goehle S., Kollipara R., Depinho R.A., Gu Y., Simon J.A. and Bedalov A. (2006). Antitumor Activity of a Small-Molecule Inhibitor of Human Silent Information Regulator 2 Enzymes. *Cancer Research* 66:4368-4377.

Herz H.M., Nakanishi S. and Shilatifard A. (2009). The Curious Case of Bivalent Marks. *Developmental Cell* 17(3):301-3.

Hirsch E., Costa C. and Ciralo E. (2007). Phosphoinositide 3-Kinases as a Common Platform for Multi-Hormone Signalling. *Journal of Endocrinology* 194:243-256.

Hu E., Chen Z., Fredrickson T., Zhu Y., Kirkpatrick R., Zhang G.F., Johanson K., Sung C.M., Liu R. and Winkler J. (2000). Cloning and Characterization of a Novel Human Class I Histone Deacetylase that Functions as a Transcription Repressor. *Journal of Biological Chemistry* 275(20): 15254-64.

Hubbert C., Guardiola A., Shao R., Kawaguchi Y., Ito A., Nixon A., Yoshida M., Wang X.F. and Yao T.P. (2002). HDAC6 is a Microtubule-Associated Deacetylase. *Nature* 417(6887): 455-8.

I

Illingworth R.S. and Bird A.P. (2009). CpG Islands : "A Rough Guide". *FEBS Letters* 583 : 1713-20.

Ismail M., Metwally A., Farghaly A., Bruce J., Tao L.F. and Bennett J.L. (1996). Characterization of Isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian Villagers that Tolerate High Doses of Praziquantel. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 55(2): 214-8

J

Jacobson R.H., Ladumer A.G., King D.S. and Tjian R. (2000). Structure and Function of a Human TAFII250 Double Bromodomain Module. *Science* 288(5470): 1422-5.

Jaenisch R. and Bird A. (2003). Epigenetic Regulation of Gene Expression. *Nature Genetics* 33(suppl.): 245-54.

Jenuwein T. and Allis C.D. (2001). Translating the Histone Code. *Science*, 293(): 1074-80.

Jiang Y.L. (2008). Design, Synthesis and Spectroscopic Studies of Resveratrol Aliphatic Acid Ligands of Human Serum Albumin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 16(12): 6406-14.

Jones P.A. and Baylin S.B. (2002). The Fundamental role of Epigenetic Events in Cancer. *Nature Reviews Genetics* 3(6): 415-28.

Jourdane J., Southgate R., Pagès J.R., Durand P. and Tchuem Tchuente L.A. (2001). Recent Studies on *Schistosoma intercalatum*: Taxonomic Status, Puzzling Distribution and Transmission Foci Revisited. *Memorial Institute Oswaldo Cruz*, 96(Suppl): 45-8.

K

Kao H.Y., Verdel A., Tsai C.C., Simon C., Juguilon H. and Kochbin S. (2001). Mechanism for Nucleocytoplasmic shuttling of HDAC7. *Journal of Biochemistry* 276(50): 47496-507.

Kawasaki H. (1), Taira K. and Yokoyama K. (2000). Histone Acetyltransferase (HAT) Activity of ATF-2 is Necessary for the CRE-Dependent Transcription. *Nucleic Acids Symposium Series* 44 : 259-60.

Kawasaki H. (2), Schiltz L., Itakura K., Taira K., Nakatani Y. and Yokoyama, K. (2000). ATF-2 has a Intrinsic Histone Acetyltransferase Activity which is Modulated by Phosphorylation. *Nature* 405():195-200.

Khan A.N. and Lewis P.N. (2006). Use of Substrate Analogs and Mutagenesis to Study Substrate Binding and Catalysis in the Sir2 Family of NAD-Dependent Protein Deacetylases. *Journal of Biological Chemistry* 281(17): 11702-11.

Khayath N., Vicogne J., Ahier A., Ben Younes A., Konrad C., Trolet J., Viscogliosi E., Brehm K. and Dissous C. (2007). Diversification of the Insulin Receptor Family in the Helminth Parasite *Schistosoma mansoni*. *FEBS Journal* 274(3): 659-76.

Khorasanizadeh S. (2004). The Nucleosome: From Genomic Organization to Genomic Regulation. *Cell* 116(2): 259-72.

Kim T.Y., Bang Y.J. and Robertson K.D. (2006). Histone Deacetylase Inhibitors for Cancer Therapy. *Epigenetics* 1(1): 14-23.

Klose R.J. and Bird A.P. (2006). Genomic DNA Methylation: The Mark and its Mediators. *TRENDS in Biochemical Sciences* 31(2): 89-97.

Kouzarides T. (2007). Chromatin Modifications and their Functions. *Cell* 128(4): 693-705.

Kunert N., Wagner E., Murawska M., Klinker H., Kremmer E. and Brehm A. (2009). dMec: A Novel Mi-2 Chromatin Remodelling Complex Involved in Transcriptional Repression. *EMBO Journal* 28(5):533-44.



- Langley E., Person M., Fretta M., Bauer U.M., Frye R.A., Minucci S., Pelicci P.G. and Kouzarides T. (2002). Human Sir2 Deacetylates p53 and Antagonizes PML/p53-Induced Cellular Senescence. *EMBO Journal* 21(10): 2383-96.
- Latham J.A. and Dent S.Y.R. (2007). Cross-Regulation of Histone Modifications. *Nature Structural and Molecular Biology* 14(11): 1017-24.
- Lau O.D., Kundu T.K., Soccio R.E., Ait-Si-Ali S., Khalil E.M., Vassilev A., Wolffe A.P., Nakatani Y., Roeder R.G. and Cole P.A. (2000). HATs off : Selective Synthetic Inhibitors of the Histone Acetyltransferases p300 and PCAF. *Molecular Cell* 5(3): 589-95.
- Lawlor M.A. and Alessi D.R. (2001). PKB/Akt: a Key Mediator of Cell Proliferation, Survival and Insulin Responses? *Journal of Cell Science* 114(Pt 16):2903-10.
- Lee H., Rezai-Zadeh N. and Seto E. (2004). Negative Regulation of Histone Deacetylase 8 Activity by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase A. *Molecular and Cellular Biology* 24(2): 765-73.
- Lee K.K. and Workman J.L. (2007). Histone Acetyltransferase Complexes : One Size Doesn't it All. *Nature Reviews* 8(4): 284-95.
- Lehtinen M.K., Yuan Z., Boag P.R., Yang Y., Villén J., Becker E.B., DiBacco S., de la Iglesia N., Gygi S., Blackwell T.K. and Bonni A. (2006). A Conserved MST-FOXO Signaling Pathway Mediates Oxidative-Stress Responses and Extends Life Span. *Cell* 125(5):987-1001.
- Levine M. and Tjian R. (2003). Transcription Regulation and Animal Diversity. *Nature* 424(6945): 147-51.
- Li J., Wang J., Wang J., Nawaz Z., Liu J.M., Qin J. and Wang J. (2000). Both Corepressor Proteins SMRT and N-CoR Exist in Large Protein Complexes Containing HDAC3. *The EMBO Journal* 19(16): 4342-50.
- Liang Y.S., Dai J.R., Zhu Y.C., Coles G.C. and Doenhoff M.J. (2003). Genetic Analysis of Praziquantel Resistance in *Schistosoma mansoni*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 34(2): 274-80
- Lin S.J., Kaerberlein M., Andalis A.A., Sturtz L.A., Defossez P.A., Culotta V.C., Fink G.R. and Guarente L. (2002). Calorie Restriction Extends *Saccharomyces cerevisiae* Lifespan by Increasing Respiration. *Nature* 418(6895):344-8.
- Lin S.J., Ford E., Haigis M., Liszt G. and Guarente L. (2004). Calorie Restriction Extends Yeast Life Span by Lowering the Level of NADH. *Genes Development* 18(1):12-6.
- Liszt G., Ford E. and Guarente L. (2005). Mouse Sir2 Homologs SIRT6 is a Nuclear ADP-Ribosyltransferase. *Journal of Biochemistry* 280(22): 21313-20.
- Longworth M.S. and Laimins L.A. (2006). Histone Deacetylase 3 Localizes to the Plasma Membrane and is a Substrate of Src. *Oncogene* 25(32): 4495-500.
- Luger K., Mader A. W., Richmond R. K., Sargent D. F. and Richmond T. J. (1997). Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution. *Nature*, 389(6648): 251-60.
- Luo J., Nikolaev A.Y., Imai S., Chen D., Su F., Shiloh A., Guarente L. and Gu W. (2001) Negative Control of p53 by Sir2 Promotes Cell Survival Under Stress. *Cell* 107:137-148.



- Magnaghi-Jaulin L., Groisman R., Naguibneva I., Robin P., Lorain S., Le Villain J.P., Troalen F., Trouche D. and Harel-Bellan A. (1998). Retinoblastoma Protein Represses Transcription by Recruiting a HDAC. *Nature* 591(6667): 601-5.
- Makowski A.M., Dutnall R.N. and Annuziati A.T. (2001). Effects of Acetylation of Histone H4 at Lysine 8 and 16 on Activity of the Hat1 Histone Acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 276(47): 43499-502.
- Marks P.A. and Jiang X. (2005). Histone Deacetylase Inhibitors in Programmed Cell Death and Cancer Therapy. *Cell Cycle* 4(4): 549-51.
- Marks P.A. and Breslow R. (2007). Dimethyl Sulfoxide to Vorinostat : Development of this Histone Deacetylases inhibitors as an anticancer drug. *Nature Biotechnologies* 25(1): 84-90.
- Marmorstein R. (2001). Structures and Function of Histone Acetyltransferases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58(5-6): 693-703.
- Marmorstein R. and Roth S.Y. (2001). Histone Acetyltransferases: Function, Structure, and Catalysis. *Current Opinion in Genetics and Development* 11(2): 155-61.
- Marmorstein R. and Trievel R.C. (2009). Histones Modifying Enzymes : Structures, Mechanisms, and Specificities. *Biochemical and Biophysical Acta* 1789(1): 58-68.
- Matsuzaki H., Daitoku H., Hatta M., Aoyama H., Yoshimochi K. and Fukamizu A. (2005). Acetylation of Foxo1 Alters its DNA-Binding Ability and Sensitivity to Phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(32): 11278-83.
- Mc Burney M.W., Yiang X., Jardine K., Hixon M., Boekelheide K., Webb J.R., Landsdorp P.M. and Lemieux M. (2003). The Mammalian Sir2alpha Protein has a Role in Embryogenesis and gametogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 23(1): 38-54.
- McKinsey T.A., Zhang C.L. and Olson E.N. (2000). Activation of the Myocyte Enhancer Factor-2 Transcription Factor by Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase-Stimulated Binding of 14-3-3 to Histone Deacetylase 5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 97(26): 14400-5.
- Méjat A., Raymond F., Bassel-Budy R., Kochbin S., Olson E.N. and Schaeffer L. (2005). FHDAC9 Couples neuronal Activity to Muscle Chromatin Acetylation and Gene Expression. *Nature Neuroscience* 8(3): 313-21.
- Merrick C.J. and Duraisingh M.T. (2007). *Plasmodium falciparum* Sir2 : An Unusual Sirtuin with Dual Histone deacetylase and ADP-Ribosyltransferase Activity. *Eukaryotic Cell* 6(11): 2081-91.
- Miska E.A., Karlsson C., Langley E., Nielsen S.J., Pines J. and Kouzarides T. (1999). HDAC4 Deacetylase Associates with and Represses the MEF2 Transcription Factor. *EMBO Journal* 18(18): 5099-107.
- Morillon A., Karabetsov N., O'Sullivan J., Kent N., Proudfoot N. and Mellor J. (2003). ISWI Chromatin Remodelling ATPase Coordinates Transcription Elongation and Termination by RNA Polymerase II. *Cell* 115(4): 425-35.
- Morris B.J. (2005). A Forkhead in the Road to Longevity : The Molecular Basis of Lifespan Becomes Clearer. *Journal of Hypertension* 23(7): 1285-309.
- Mottet D. and Castronovo V. (2008). Les Histones Désacétylases : Nouvelles Cibles pour les Thérapies anti-Cancéreuses. *Médecine/Science* 24 : 742-6.

Moyihan K.A., Grimm A.A., Plueger M.M., Bernal-Mizrachi E., Ford E., Cras-Méneur C., Permutt M.A. and Ismai S. (2005). Increased Dosage of Mammalian Sir2 in Pancreatic beta Cells enhances Glucose-stimulated Secretion in Mice. *Cell Metabolism* 2(2): 105-7.

Munshi A., Shafi G., Aliya N. and Jyothya A. (2009). Histone Modifications Dictate Specific Biological Readouts. *Journal of Genetics and Genomics* 36 : 75-88.

W

Nebbio A., Clarke N., Voltz E., Germain E., Ambrosino C. Bontempo P, Alvarez R., Schiavone E.M., Ferrara F., Bresciani F., Weisz A., de Lare A.R., Gronemeyer H. and Altucci L. (2005). Tumor-selective Action of HDACi Involves TRAIL Induction in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Nature Medicine* 11(1): 77-84.

Nelson C.J., Santos-Rosa H. and Kouzarides T. (2006). Proline Isomerization of Histone H3 Regulates Lysine Methylation and Gene Expression. *Cell* 126(5): 905-16.

Nemoto S., Fergusson M.M. and Finkel T. (2004). Nutrient Availability Regulates SIRT1 Through a Forkhead-Dependent Pathway. *Science* 306(5704): 2105-8.

Neugebauer R.C., Uchiechowska U., Meier R., Hruby H., Valkov V., Verdin E., Sippl W. and Jung M. Structure-Activity Studies on Splitomicin Derivatives as Sirtuin Inhibitors and Computational Prediction of Binding Mode. *Journal of Medicinal Chemistry* 51:1203-1213.

North B.J. and Verdin E. (2004). Sirtuins : Sir2-related NAD-dependent Protein Deacetylases. *Genome Biology* 5(5): 224.

O

O'Brien T. and Tjian R. (1998). Functional Analysis of the Human TAFII250 N-terminal Kinase Domain. *Molecular Cell* 1(6): 905-11.

Oger F., Bertin B., Caby S., Dalia-Cornette J., Adams M., Vicogne J., Capron M. and Pierce R.J. (2006). Molecular Cloning and Characterization of *Schistosoma mansoni* Ftz-F1 Interacting Protein-1 (SmFIP-1), a Novel Corepressor of the Nuclear Receptor SmFtz-F1. *Molecular and Biochemical Parasitology* 148(1): 10-23.

Oger F., Dubois F., Caby S., Noël C., Cornette J., Bertin B., Capron M. and Pierce R.J. (2008). The Class I Histone Deacetylases of the Platyhelminth Parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 377(4):1079-84.

Ohmae H., Sinuon M., Kiriniki M., Matsumoto J. Chigusa Y., Socheat D. and Matsuda H. (2004). Schistosomiasis mekongi : From Discovery to Control. *Parasitology International* 53(2): 135-42.

Ouaissi M. and Ouaissi A. (2006). Histone Deacetylase Enzymes as Potential Drug Targets in Cancer and Parasitic Diseases. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2006(2): 13474.

Owen D.J., Ornaghi P., Yang J.C., Lowe N., Ewans P.R., Neuhaus D., Filetici P. and Travers A.A. (2000). The Structural Basis for the Recognition of Acetylated H4 by the Bromodomain of Histone Acetyltransferase Gcn5p. *The EMBO Journal* 19(22): 6141-9.

P

Perche P.Y., Robert-Nicoud M., Khahbin S. and Vourc'h C. (2003). Différenciation du Nucléosome : Le Rôle des Variants de l'Histone H21. *Médecine/Science* 19(11): 1137-45.

Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C. and Ferrin T.E. (2004). UCSF Chimera : A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25(13): 1605-12.

Pica-Mattoccia L., Orsini T., Basso A., Festucci A., Liberti P., Guidi A., Marcato-Maggi A.L., Nobre-Santana S., Troiani A.R., Cioli D and Valle C. (2008). *Schistosoma mansoni* : Lack of Correlation Between Praziquantel-Induced Intra-Worm Calcium Influx and Parasite Death. *Experimental Parasitology* 119(3):332-5.

Pica-Mattoccia L. Doenhoff M.J., Valle C., Basso A., Troiana A.R., Liberti P., Festucci A., Guidia A. and Cioli D. (2009). Genetic Analysis of Decreased Praziquantel Sensitivity in a Laboratory Strain of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica* 111(1): 82-5.

Pillus L. (2008). MYSTs Mark Chromatin for Chromosomal Functions. *Current Opinion in Cell Biology* 20(30): 326-33.

Pray-Grant M.G., Daniel J.A., Schieltz D., Yates J.R. 3rd and Grant P.A. (2005). Chromodomain Links H3 Methylation with SAGA and SILK-dependent Acetylation. *Nature* 433(7024): 434-8.

Prouteau M. and Colot V. (2005). Epigenetic Control, Development and Natural Genetic Variation in Plants. *Médecine/Science* 21(4):422-7.

Prusty D., Mehra P., Srivastava S., Shivange A.V., Gupta A., Roy N. and Dhar S.K. (2008). Nicotinamide Inhibits *Plasmodium falciparum* Sir2 Activity *in vitro* and Parasite Growth. *FEMS Microbiology Letters* 282(2):266-72.

Pusarla R. H. and Bhargava P. (2005). Histones in Functional Diversification. Core Histone Variants. *Febs Journal*, 272(20): 5149-68.

R

Rassoulzadegan M., Grandjean V., Gounon P., Vincent S., Gillot I. and Cuzin F.. (2006). RNA-Mediated Non-Mendelian Inheritance of an Epigenetic Change in the Mouse. *Nature* 441(7092):469-74.

Rechsteiner M. and Rogers S.W. (1996). PEST Sequences and Regulation by Proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences* 21(7):267-71.

Riester D., Hildmann C. and Schwienhorst A. (2007). HDACi : Turning Epigenic Mechanisms of Gene Regulation in Tools of Therapeutic Intervention in Malignant and Other Diseases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75(3): 499-514.

Ris-Vicari K. (2007) *Nature Structural & Molecular Biology* 14(11): 1110-5.

Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S. and Bonner W.M. (1998). DNA Double Stranded Breaks Induce Histone H2A-X Phosphorylation on Serine 139. *Journal of Biological Chemistry* 273(10): 5858-68.

Roger E., Grunau C., Pierce R.J., Hirai H., Gourbal B., Galinier R., Emans R., Cesari I.M., Cosseau C. and Mitta G. (2008). Controlled Chaos of Polymorphic Mucins in a Metazoan Parasite (*Schistosoma mansoni*) Interacting with Its Invertebrate Host (*Biomphalaria glabrata*). *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2(11):e330.



- Saha A., Wittmeyer J. and Cairns B.R. (2006). Chromatin Remodelling : The Industrial Revolution of DNA Around Histones. *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology* 7(6): 437-47.
- Sanders B.D., Jackson B., Brent M., Taylor A.M., Dang W., Berger S.L., Schreiber S.L., Howitz K. and Marmorstein R. (2009). Identification and Characterization of Novel Sirtuin Inhibitor Scaffolds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17(19):7031-41.
- Santos-Rosa H., Valls E., Kouzarides T. and Martinez-Balbas M. (2003). Mechanisms of P/CAF Autoacetylation. *Nucleic Acid Research* 31(15): 4285-92.
- Selman C., Lingard S., Choudhury A.I., Batterham R.L., Claret M., Clements M., Ramadani I., Okbenhaug K., Schuster E., Blanc E., Piper M.D., Al-Quassab H., Speakman J.R., Carmignac D., Robinson I.C.A., Thornton J.M., Gems D., Partridge L. and Withers D.J. (2008). Evidence for Lifespan Extension and Delayed Age-Related Biomarkers in Insulin Receptor Substrate 1 Null Mice. *The FASEB Journal* 22(3): 807-18.
- Shahbazian M.D. and Grunstein M. (2007). Functions of Site-specific Histone Acetylation and Deacetylation. *Annual reviews of Biochemistry* 76(): 75-100.
- Shen X., Yu L., Weir J.W. and Gorovsky M.A. (1995). Linker Histones are not Essential and Affect Chromatin Condensation In Vivo. *Cell* 82(1): 47-56.
- Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstine J.R., Cole P.A., Casero R.A. and Shi Y. (2004). Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. *Cell* 119(7): 941-53.
- Shiio Y. and Eisenman R. N. (2003). Histone Sumoylation is Associated with Transcriptional Repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A* 100(23): 13225-30.
- Shilatifard A. (2006). Chromatin Modifications by Methylation and Ubiquitination : Implications in the Regulation of Gene Expression. *Annual Review of Biochemistry* 75 : 243-69.
- Shogren-Knaak M., Ishii H., Sun J.M., Pazin M.J., Davie J.R. and Peterson C.L. (2006). Histone H4-K16 Acetylation Controls Chromatin Structure and Protein Interactions. *Science* 311(5762):844-7.
- Somoza J.R., Skene R.J., Katz B.A., Mol C., Ho J.D., Jennings A.J., Luong C., Arvai A., Buggy J.J., Chi E., Tang J., Sang B.C., Verner E., Wynands R., Leahy E. M., Dougan D.R., Snell G., Navre M., Knuth M.W., Swanson R.V., McRee D.E. and Tari L.W. (2004). Structural Snapshots of Human HDAC8 Provide Insights into the Class I Histone Deacetylases. *Structure* 12(7): 1325-34.
- Stelma F.F., Talla I., Sow S., Kongs A., Niang M., Polman K., Deelder A.M. and Gryseels B. (1995). Efficacy and Side Effects of Praziquantel in an Epidemic Focus of *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53(2): 167-70.
- Sterner D.E. and Berger S.L. (2000). Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(2): 435-59.
- Strahl B.D. and Allis C.D. (2000). The Language of Covalent Histone Modifications. *Nature* 403: 41-5.
- Strobl J.S., Cassell M., Mitchell S.M., Reilly C.M. and Lindsay D.S.(2007). Scriptaid and Suberoylanilide Hydroxamic Acid are Histone Deacetylase Inhibitors with Potent anti-*Toxoplasma gondii* Activity *in vitro*. *Journal of Parasitology* 93(3):694-700.
- Stroud J.C., Wu Y., Bates D.L., Han A., Nowick K., Paabo S., Tong H. and Chen L. (2006). Structure of the Forkhead Domain of FOXP2 Bound to DNA. *Structure* 14(1):159-66.
- Sudarsanam P. and Winston F. (2000). The Swi/Snf Family Nucleosome-Remodeling Complexes and Transcriptional Control. *TRENDS in Genetics*, 16(8): 345-51.

Suka N., Luo K. and Grunstein M. (2002). Sir2p and Sas2p Opposingly Regulate Acetylation of Yeast Histone H4 Lysine 16 and Spreading of Heterochromatin. *Nature Genetics* 32 : 378-83.

Sun C., Zhang F., Ge X., Yan T., Chen X., Shi X. and Zhai Q. (2007). SIRT1 Improves Insuline Sensitivity Under Insulin-resistant Conditions by Repressing PTP1B. *Cell Metabolism* 6(4), 307-19.

Sun Z.W. and Allis C.D. (2002). Ubiquitination of Histone H2B Regulates H3 Methylation and Gene Silencing in Yeast. *Nature* 418(6893): 104-8.

Suto R.K., Clarkson M.J. Tremethick D.J. and Luger K. (2000). Crystal Structure of a Nucleosome Core Particle Containing the Variant Histone H2A.Z. *Nature Structural Biology* 7(12): 1121-4.

T

Taunton J., Hassig C.A. and Schreiber S.L. (1996). A Mammalian Histone Deacetylase Related to the Yeast Transcriptional Regulator Rpd3p. *Science* 272(5260): 408-11.

Thomas T. and Voss A.K. (2007). The Diverse Biological Roles of MYST Histone Acetyltransferase Family Proteins. *Cell Cycle* 6(6): 696-704.

Thompson P.R., Wang D., Wang L., Fulco M. Pediconi N., Zhang D., An W., Ge Q., Roeder R.G., Wong J., Levrero M., Sartorelli V., Cotter R.J. and Cole P.A. (2004). Regulation of the p300 HAT Domain via a Novel Activation Loop. *Nature Structural and Molecular Biology* 11(4): 308-15.

Timmermann S., Lehrmann H. Poleskaya A. and Harel-Bellon A. (2001). Histone Acetylation and Disease. *Cellular and Molecular Life Science* 58(): 728-36.

Tissenbaum H.A. and Guarente L. (2001). Increased Dosage of a Sir2 Gene Extends Lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410(6825): 227-30.

Tissenbaum H.A. and Guarente L. (2002). Model Organisms as a Guide to Mammalian Aging. *Developmental Cell* 2(1): 9-19.

Tsang A.W. and Escalante-Semerena J.C. (1996). CobB Function is Required for Catabolism of Propionate in *Salmonella typhimurium* LT2 : Evidence for Existence of a Utilization (pdu) Operon. *Journal of Bacteriology* 178(): 016-9.

U

Ungerstedt J.S., Sowa Y., Xu W.S., Shao Y., Dokmanovic M., Perez G., Ngo L., Holmgren A., Jiang X. and Marks P.A. (2005). Role of Thioredoxin in the Response of Normal and Transformed Cells to Histone Deacetylase Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 102(3): 673-8.

Uciechowska U., Schemies J., Neugebauer R.C., Huda E.M., Schmitt M.L., Meier R., Verdin E., Jung M. and Sippl W. (2008) Thiobarbiturates as Sirtuin Inhibitors: Virtual Screening, Free-Energy Calculations, and Biological Testing. *ChemMedChem* 3:1965-1976.

V

van den Wyngaert I., de Vries W., Kremer A., Neefs J., Verhasselt P., Luyten W.H. and Kass S.U. (2000). Cloning and Characterization of Human HDAC8. *FEBS Letter* 478(): 77-83.

van der Heide L.P., Hoekman M.F. and Schmidt M.P. (2004). The Ins and Outs of OXO Shuttling : Mechanisms of FOXO Translocation and Transcriptional Regulation. *Biochemical Journal* 380(Pt2): 297-309.

van de Heide L.P. and Smidt M.P. (2005). Regulation of FoxO Activity by CBP/p300-Mediated Acetylation. *Trends in Biochemical Science* 30(2): 81-6.

van der Werf M.J., de Vlas S.J., Brooker S., Looman C.W., Nagelkerke N.J., Habbema J.D. and Engels D. (2003). Quantification of Clinical Morbidity Associated with Schistosome Infection in Sub-Saharan Africa. *Acta Tropica* 86(2-3): 125-39.

Vannini A., Volpari C., Filocamo G., Casavola E.C., Brunetti M., Renzoni D., Chakravarty P., Paolini C., De Francesco R., Gallinari P., Steinkuhler C. and Di Marco S. (2004). Crystal Structure of a Eukaryotic Zinc-Dependent Histone Deacetylase, Human HDAC8, Complexed with a Hydroxamic Acid Inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(42): 15064-9.

Vaziri H., Dessain S.K., Ng Eaton E., Ismai S.I., Frye R.A., Pandita T.K., Guarente L. and Weinberg R.A. (2001). HSir2 (SIRT1) Functions as an NAD-dependent p53 Deacetylase. *Cell* 107(2): 149-59.

Vennervald B.J. and Dunne D.W. (2004). Morbidity in Schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 17(5):439-447.

Vergnes B., Vanhille L., Ouaiissi A. and Sereno D. (2005). Stage-Specific Antileishmanial Activity of an Inhibitor of SIR2 Histone Deacetylase. *Acta Tropica* 94(2):107-15.

Vidal M. and Gaber R.F. (1991). RPD3 Encodes a Second Factor Required to Achieve Maximum Positive and Negative Transcriptional States in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 11(): 317-27.

W

WellcomeTrust (1998). "Topics in International Health, Schistosomiasis". The Trustee of the Wellcome Trust, CABI publishing.

Wolffe A. P. (1997). Histone H1. *International Journal of Biochemistry and Cellular Biology* 29(12): 1463-6.

Wolffe A.P. and Hayes J.J. (1999). Chromatin Disruption and Modification. *Nucleic Acid Research* 27(3): 711-20.

Wu X., Li H., Ark E.J. and Chen J.D. (2001). SMRTE Inhibits MEF2C Transcriptional Activation by Targeting HDAC4 and HDAC5 to Nuclear Domains. *Journal of Biological Chemistry* 276(26): 24177-85.

Y

Yang X. and Seto E. (2008). The Rpd3/Hda1 Family of Lysine Deacetylases : From Bacteria and Yeast to Mice and Men. *Nature Reviews Molecular and Cellular Biology* 9(3): 206-18.

Yao Y.L., Yang W.M. and Seto E. (2001). Regulation of Transcription Factor YY1 by Acetylation and Deacetylation. *Molecular and Cellular Biology* 21(17): 5979-91.

Yeung F., Hoberg J.E., Ramsey C.S., Keller M.D., Jones D.R., Frye R.A. and Mayo M.W. (2004). Modulation of NF- κ B Dependent Transcription and Cell Survival by the SIRT1 Deacetylase. *EMBO Journal* 23(12): 2369-80.

Yoshida M., Kijima M., Akita M. and Beppu T. (1990). Potent Specific Inhibition of Mammalian HDAC Both in Vivo and in Vitro by Trichostatin A. *Journal of Biological Chemistry* 265(8): 17174-9.

You H., Zhang W, Mooertel L., McManus D.P. and Gobert G.N. (2009). Transcriptional Profiles of Adult Male and Female *Schistosoma japonicum* in Response to Insulin Reveal Increased Expression of Genes Involved in Growth and Development. *International Journal of Parasitology* 39: 1551-1559.

Youngson N.A. and Whitelaw E. (2008). Transgenerational Epigenetic Effects. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9: 233-57.

g

Zhang Y. (2003). Transcriptional regulation by Histone Ubiquitination and Deubiquitination, *Genes Development* 17(22): 2733-40.

Zhang X., Ozawa Y., Lee H., Wen Y.D., Tan T.H., Wadzinski B.E. and Seto E. (2005). Histone Deacetylase 3 (HDAC3) Activity is Regulated by Interaction with Protein Serine/Threonine Phosphatase 4. *Genes Development* 19(7): 827-39.

Zheng Y.G., Wu J., Chen Z. and Goodman M. (2008). Chemical Regulation of Epigenetic Modifications : Opportunities for New Cancer Therapy. *Medicinal Research Reviews* 28(5): 645-87.