

N° d'ordre:

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE
LILLE FLANDRES-ARTOIS**

THÈSE DE DOCTORAT

présentée à l'université de Lille I pour l'obtention du titre de

Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

par

YAHIAOUI Bilel

**Clonage et caractérisation moléculaire d'un ADNc de
Leishmania major codant pour une protéine
homologue au produit du gène *SIR2* de *Saccharomyces
cerevisiae*.**

Soutenue le 28 Septembre 1995 devant la commission d'examen



Membres du jury:

Président:

Professeur A. Dhainaut

Rapporteurs:

Dr. J. F. Dubremetz

Dr. M. Pages

Examineurs:

Dr. J. L. Lemesre

Dr. M. A. Ouaisi

SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION.....	10
PRESENTATION DES LEISHMANIOSES.....	12
BUT DU TRAVAIL.....	61
TRAVAUX PERSONNELS.....	64
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	116
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	127
TABLE DES MATIERES.....	152

	Page
Abréviations.....	7
INTRODUCTION.....	11
1. PRESENTATION DES LEISHMANIOSES.....	12
1.1. Historique.....	12
1.2. Répartition géographique des leishmanioses.....	13
1.2.1. Le foyer méditerranéen.....	13
1.2.2. Le foyer indien.....	13
1.2.3. Le foyer chinois.....	13
1.2.4. Le foyer d'Asie centrale.....	13
1.2.5. Le foyer d'Afrique tropicale.....	13
1.2.6. Le foyer sud-américain.....	15
1.3. Les parasites.....	15
1.4. Les vecteurs.....	15
1.5. Cycle évolutif des leishmanies.....	17
1.6. Les différentes formes de la leishmaniose.....	19
1.6.1. La leishmaniose viscérale.....	19
1.6.1.1. Signes cliniques.....	19
1.6.1.2. Signes biologiques.....	20
1.6.2. Les leishmanioses cutanées.....	20
1.6.2.1. Signes cliniques.....	20
1.6.2.2. Signes biologiques.....	22
1.6.3. La leishmaniose cutanéomuqueuse (Espundia).....	22

1.7.	Diagnostic des leishmanioses.....	22
1.7.1.	Examens direct.....	22
1.7.2.	Test d'hypersensibilité retardée.....	23
1.7.3.	Diagnostic immunologique.....	23
1.7.4.	Les sondes ADN spécifiques d'espèces.....	24
1.8.	Traitement.....	25
1.8.1.	Antimoniés pentavalents.....	25
1.8.2.	Iséthionate de pentamidine.....	26
1.8.3.	Amphotéricine B.....	26
1.8.4.	Allopurinol.....	26
1.8.5.	L'immunothérapie.....	27
2.	BIOLOGIE CELLULAIRE DES LEISHMANIES.....	27
2.1.	Ultrastructure et organites spécifiques des <i>kinetoplastida</i>	27
2.1.1.	Membrane, microtubules et cytosquelette.....	27
2.1.2.	Le kinétoplaste.....	27
2.1.3.	La poche flagellaire et le flagelle.....	28
2.1.4.	Les glycosomes.....	28
2.2.	Relations hôte-parasite.....	29
2.2.1.	Développement des leishmania chez le vecteur et leur transmission.....	29
2.2.2.	La métacyclogénèse des promastigotes des leishmanies.....	30
2.2.3.	Interaction des leishmanies avec les macrophages.....	31
2.2.3.1.	Les récepteurs (CR1/CR3).....	32
2.2.3.2.	Les récepteurs de la fibronectine, mannose-fucose et AGE.....	32
2.2.3.3.	Rôle des molécules de surface des leishmanies.....	32
3.	BIOLOGIE MOLECULAIRE DES LEISHMANIES.....	34
3.1.	Le génome des leishmanies.....	34

3.2.	L'ADN kinétoplastique.....	35
3.2.1.	Les maxi-cercles.....	35
3.2.2.	Les mini-cercles.....	35
3.3.	L'édition de l'ARN.....	36
3.3.1.	L'ARN guide.....	36
3.3.2.	Le mécanisme de l'édition.....	37
3.4.	Les éléments de séquences régulatrices en <i>cis</i> de l'expression des gènes des <i>Trypanosomatidae</i>	38
4.	GENERALITES SUR LA REPRODUCTION SEXUEE.....	40
4.1.	Définition de la reproduction sexuée.....	40
4.2.	Origine de la diploïdie.....	40
4.3.	Origine de la méiose.....	41
4.4.	La différenciation sexuelle.....	41
5.	LA COMMUTATION DU TYPE SEXUEL CHEZ LA LEVURE.....	42
5.1.	Structure et organisation des loci <i>HML</i> α , <i>HMR</i> <i>a</i> , <i>MAT</i> α et <i>MAT</i> <i>a</i>	43
5.2.	Le contrôle physiologique et génétique de la commutation.....	44
5.3.	Le mécanisme moléculaire de la commutation du locus <i>MAT</i>	44
5.3.1.	La coupure de <i>MAT</i> par l'endonucléase HO.....	44
5.3.2.	La digestion des extrémités par une exonucléase 5'→3'.....	44
5.3.3.	Invasion du site donneur et extension d'amorce.....	46
5.3.4.	Les étapes finales de la commutation.....	46
5.4.	Programmation et choix de la direction de déplacement de la cassette..	47
5.5.	Les protéines régulatrices codées par les gènes <i>MAT</i> <i>a</i> et <i>MAT</i> α	47
5.6.	La répression des loci <i>HML</i> et <i>HMR</i>	48
5.7.	Les sites de répression agissant en <i>cis</i>	49
5.8.	Les gènes qui agissent en trans dans le mécanisme de la répression...	50
5.9.	La répression au niveau des télomères.....	50
5.10.	Rôles des protéines SIR1-4.....	51

6. LE MODE DE PROPAGATION DES <i>TRYPANOSOMATIDAE</i>.....	53
6.1. Méthodologie et approches expérimentales.....	53
6.1.1. La méthode cytologique.....	53
6.1.2. La méthode biochimique: analyses isoenzymatiques.....	54
6.1.3. Les méthodes de biologie moléculaire.....	54
6.1.4. Utilisation des marqueurs de sélection.....	55
6.2. Les évidences en faveur de l'existence d'une reproduction sexuée.....	55
chez les <i>Trypanosomatidae</i>	55
6.2.1. Cas de <i>Trypanosoma brucei</i>	55
6.2.2. Cas des leishmanies.....	57
6.3. La théorie clonale.....	59
BUT DU TRAVAIL.....	61
TRAVAUX PERSONNELS.....	64
Article n°1: Caractérisation d'antigènes de <i>Leishmania</i> , localisés dans des vésicules cytoplasmiques assimilables aux endosomes des eucaryotes supérieurs.....	65
Article n°2: Clonage et caractérisation moléculaire d'un ADNc de <i>Leishmania major</i> codant pour une protéine homologue au produit du gène <i>SIR2</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	93
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	116
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	127
TABLE DES MATIERES.....	152



Résumé

Au cours de ce travail, nous avons caractérisé des antigènes du stade promastigote de *L. major* se fixant sur une colonne de glutathion (LmGbp). Le sérum dirigé contre ces antigènes (anti-LmGbp) a permis de montrer que ces molécules sont sécrétées par le parasite et qu'elles sont exprimées chez l'amastigote ainsi que chez d'autres espèces de *Leishmania*. Parmi ces molécules, une protéine de poids moléculaire apparent de 66 kDa (p66) est révélée par l'anti-LmGbp en Western-blot dans les extraits antigéniques de toutes les espèces testées. A l'aide de la technique d'immunofluorescence et de la microscopie électronique, on a pu montrer que la p66 est localisée dans des structures tubulo-vésiculaires ressemblant aux endosomes des eucaryotes supérieurs et aux mégasomes décrits chez les leishmanies.

Le criblage d'une banque d'expression d'ADNc de *L. major* à l'aide du sérum anti-LmGbp, a permis d'isoler et de séquencer plusieurs inserts, dont l'un (LmSIR2rp) code pour une protéine présentant une homologie avec le produit du gène *SIR2* de *Saccharomyces cerevisiae*. L'ADNc correspondant à LmSIR2rp révèle un cadre de lecture ouvert de 381 acides aminés, codant pour une protéine de 41963 Da. La séquence de LmSIR2rp présente un motif polypeptidique CysX2CysX20CysX2Cys pouvant constituer un site éventuel de fixation du zinc. De plus, la partie C-terminale est riche en serines (16 Ser sur 40 acides aminés) qui représentent des sites potentiels de phosphorylation. La taille du messenger de LmSIR2rp en Northern-blot est de 1.8 kb et semble être transcrit à partir d'un seul gène.

D'autre part, on a produit par immunisation un sérum dirigé contre une séquence peptidique conservée (pep 58-76) de LmSIR2rp. Cet anti-peptide révèle une bande majeure de 42 kDa, lorsqu'il est utilisé en Western-blot sur l'extrait total de *L. major* et dans l'immunoprécipitation des produits de traduction *in vitro*, ce qui confirme le cadre de lecture de LmSIR2rp. Par ailleurs, l'anti-peptide 58-76 reconnaît en Western-blot une bande de 64 kDa dans l'extrait d'une souche de levure qui surexprime le gène *SIR2*. Aucune réaction n'a été observée sur le contrôle négatif constitué par les antigènes d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* mutante pour *SIR2*. Sachant que *SIR2* fait 63.2 kDa, nous confirmons ainsi l'homologie de séquence.

La caractérisation d'une nouvelle protéine de *L. major*, présentant une homologie avec l'un des facteurs de régulation jouant à la fois un rôle dans la commutation du type-sexuel et dans la répression des gènes télomériques chez la levure, nous permettra d'aborder les aspects de différenciation cellulaire, de régulation de l'expression des gènes et la question fortement débattue concernant l'existence de la reproduction sexuée chez les *Trypanosomatidae*.