



HAL
open science

Exploration fonctionnelle de protéines mitochondriales et étude du protéasome 'mitochondrial' HslVU, cible thérapeutique potentielle, chez les Trypanosomatidés.

Diane-Ethna Mbang-Benet

► **To cite this version:**

Diane-Ethna Mbang-Benet. Exploration fonctionnelle de protéines mitochondriales et étude du protéasome 'mitochondrial' HslVU, cible thérapeutique potentielle, chez les Trypanosomatidés.. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université Montpellier 1, 2012. Français. NNT: . tel-03200082

HAL Id: tel-03200082

<https://hal.science/tel-03200082>

Submitted on 16 Apr 2021

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.

UNIVERSITE MONTPELLIER I

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER I

Discipline : Biochimie et Biologie Moléculaire ; Biologie Cellulaire

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

présentée et soutenue publiquement

par

Diane-Ethna MBANG-BENET

Le 13 décembre 2012

Titre :

Exploration fonctionnelle de protéines mitochondriales et étude du protéasome 'mitochondrial' HsIVU, cible thérapeutique potentielle, chez les Trypanosomatidés.

JURY

M. BAKALARA Norbert	, Président
M. BRINGAUD Frédéric	, Rapporteur
M. FASEL Nicolas	, Rapporteur
M. LANG Thierry	, Examineur
M. BASTIEN Patrick	, Directeur de Thèse

"La persévérance, c'est ce qui rend l'impossible possible, le possible probable et le probable réalisé"

-Robert Half-

Remerciements

Voilà quatre années passées depuis le début de ma thèse et me voici à quelques scènes du clap de fin ! Cette thèse a été une aventure soutenue, semée à la fois d'embuches et de moments formidables, mais elle reste surtout une expérience très enrichissante tant scientifiquement qu'humainement. Je tiens donc à remercier tous ceux qui ont rendu, de près ou de loin, ce travail possible.

Je veux tout d'abord exprimer toute ma gratitude aux membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail. Merci à **Frédéric BRINGAUD** et à **Nicolas FASEL**, mes rapporteurs, pour le temps précieux qu'ils ont accordé à ce travail. Merci également à **Thierry LANG** pour avoir accepté d'être présent aujourd'hui pour juger mon travail.

Je voudrais tout particulièrement remercier également **Norbert BAKALARA**, président du Jury, et **Nicolas FASEL**, ainsi qu'**Olivier COUX** et **Fabienne MISGUICH** pour leur accompagnement tout au long de ces quatre années comme membres de mon comité de thèse.

Je voudrais ensuite remercier **Patrick BASTIEN** et **Michel PAGES**, mes Directeurs de thèse pour la confiance qu'ils m'ont accordée en me confiant ce projet ambitieux.

Merci Patrick pour ton soutien tout au long de ces quatre années, pour tout le temps passé à corriger ce travail, pour les conseils précieux et pour ce souci constant de veiller sur moi, sur tant de domaines.

A toi Michel, je ne sais comment formuler toute ma gratitude. Il n'y a en effet pas de mots suffisamment forts pour t'exprimer toute ma reconnaissance. Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans ton soutien. Merci pour ton implication, pour tes conseils. Merci pour tout ce que tu m'as appris, pour la confiance que tu m'as permis d'acquérir dans mon travail.

Merci à toi **Yvon**, pour m'avoir aidé dans les étapes véritablement décisives de ce travail. Merci pour ton dynamisme, ton pragmatisme et ta disponibilité. Et même s'il n'a pas toujours été facile de te suivre (tu marches plus vite que ton ombre !).

Merci ensuite à **Christine BLAINEAU** pour toutes les bases en culture cellulaire que tu m'as données. C'est grâce à toi que j'ai confiance dans mon travail.

Merci à toi **Lucien**. En fait je pense que ce travail n'a été possible que grâce à ton soutien indéfectible, dans toutes étapes. Merci d'avoir toujours pu compter sur toi. Ta

générosité, ta disponibilité, ton savoir-faire et surtout ton amitié ont été essentiels pour moi tout au long de ces années.

Merci ensuite à toi **Gilles** pour tes conseils précieux de chercheur expérimenté et pour m'avoir initiée aux contrepèteries, ces petits exercices ont égayés tant de moments à la paillasse.

Un grand merci ensuite à toi **Michèle** pour ta gentillesse et pour l'attention sincère que tu sais accorder à tout le monde autour de toi.

Merci ensuite à toi **Christophe** pour ta gentillesse, pour nos discussions toujours intéressantes, pour tes conseils aguerris et pour ta bienveillance.

Merci à **Yves** pour ton aide toujours précieuse en Informatique, tu m'as aidée à éviter tant de catastrophes ! Merci aussi pour ta bonne humeur permanente et tes conseils précieux dans tout ce qui est administratif universitaire, un vrai casse-tête pour moi.

Merci à **Laurence, à Nada et à Nathalie** pour votre gentillesse.

Merci à **Loïc** et à **Patrick (LAMI)**, mes acolytes de la salle de culture ! Merci de rendre ces longues heures de travail en salle de culture toujours agréables. Merci Loïc pour ton efficacité dans tant de domaines, tu m'as facilité le travail tant de fois.

Merci ensuite à vous que je considère comme des amies, **Christelle** et **Olivia**. Merci d'avoir égayé ces années avec de bonnes parties de rigolades à la paillasse, au bureau ou autour d'un café. Merci aussi pour l'entraide les unes les autres dans le travail au quotidien.

Merci à **Didier Basset**, pour toute ta gentillesse et pour ton amitié. J'espère que tu profites bien de ta retraite active pour réaliser tous les projets qui te tenaient à cœur.

Je voudrais aussi remercier toutes les autres personnes du labo, côté hospitalier, les secrétaires pour leur gentillesse et tous les stagiaires qui sont passés au labo.

Merci aussi à toute l'équipe du laboratoire de Nicolas FASEL à Lausanne : **Clara, Habib, Haroun, Chantal** et tous les autres, pour votre gentillesse et pour cet accueil formidable que vous m'avez réservé durant tout le mois que j'ai passé dans votre labo.

Je tiens aussi à remercier la Fondation **Infectiopole Sud**, pour avoir financé trois années de cette thèse et permis la réalisation de ce travail.

Je remercie aussi les autorités de mon pays, **le Gabon**, pour leur soutien indéfectible durant ces quatre années.

Je voudrais terminer en remerciant mes proches pour leur soutien permanent.

A mes frères, sœurs, nièces, cousines... :

Merci à **Priscilla** et à **Ulrich**, merci pour votre amour et pour votre bienveillance. Votre soutien permanent m'aide à avancer.

Merci à mes nièces : **Thia-Brittany** « mon bébé », merci de nous avoir redonné l'envie de continuer et la force d'y croire à nouveau. Merci à **Annabelle** alias « bébé Babel » pour être aussi magnifique. Merci de me remplir de tant de bonheur toutes les deux.

Merci à toi ma **Ginette**, ma « sœur de cœur », merci pour tout l'amour et la confiance que tu me portes. Même si loin d'ici je sais que tu veilles sur moi et je sais que quoi que je fasse tu seras toujours fière de moi et ça m'aide à donner le meilleur de moi.

Merci aussi à toi ma « sister » **Gordona-Cynthia**, ma cousine adorée. Merci pour ces sentiments sincères qu'on partage et pour tout le soutien que tu m'apportes au quotidien.

Merci à toi **Tatiana**, ma sœur, ma meilleure amie, ma presque maman aujourd'hui, parce que c'est désormais toi qui veille sur nous et qui assure la cohésion de notre petite famille. Merci de croire autant en moi, tu es mon moteur au quotidien. Merci pour tout.

A mes amis très chers : **Sandra-Nadia**, **Marlyse**, **Gisèle**, **Olivia** et **André** (parti trop tôt). Votre amitié sincère, nos fous rires, nos chagrins partagés, tout cela m'a aidé à tenir tout au long de ces années, merci d'être toujours là pour moi.

A mes beaux-parents **Renée** et **Jean-Pierre**, j'ai trouvé en vous une véritable famille, merci de m'apporter cet équilibre essentiel.

Merci mon **papa Modeste** d'assurer ce rôle de papa, merci de me donner cet équilibre.

A mon "**Papa Tonton**", merci pour tout ce que tu nous as donné, à très bientôt...

A toi **Cyril**, que puis-je te dire ? Tu es mon essentiel, mon socle, mon équilibre. Merci de me supporter depuis 7 ans déjà, c'est grâce à ce soutien que j'ai pu y arriver.

Je vais finir ces remerciements en remerciant une femme exceptionnelle : **Mme Viviane ANDEME**, ma maman, partie trop tôt... c'est à toi que je dédie ce travail. J'espère que de là haut tu seras fière de moi.

SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	17
RESUME / ABSTRACT.....	21
ABREVIATIONS	29
INTRODUCTION GENERALE	31
REVUE DE LA LITTERATURE.....	39
A -L'Ordre des Kinétoplastida.	41
B. <i>Leishmania</i> et leishmanioses.	43
B1. Les leishmanioses	43
B2. Cycle de vie des leishmanies.....	49
C. <i>Trypanosoma brucei</i> et la trypanosomiase africaine.....	57
C.1. La trypanosomiase humaine africaine ou maladie du sommeil.....	57
C.2. Cycle de vie des trypanosomes	61
D. Particularités de la biologie moléculaire et cellulaire des Trypanosomatidés	69
D.1. Particularités en biologie cellulaire	69
D.2. Particularités biochimiques	73
D.3. Particularités en biologie moléculaire.....	77
E. Le cycle cellulaire chez les <i>Trypanosomatidés</i>	85
E.1. Description du cycle cellulaire	85
E.3. Liens et points de contrôle entre les divers événements du cycle cellulaire	97
E.4. Lien cycle cellulaire/différenciation	107
F. "Les" protéasomes.....	111
F.1. La protéolyse cellulaire.....	111
F.3. Le système protéasome	117
F.4. Le complexe HslVU.....	139
CHAPITRE 1	149
Etude du protéasome d'origine bactérienne "HslVU" chez les Trypanosomatidés.....	149
B. Publication (article soumis)	153
C1. Les sous-unités HslU1 et HslU2 ne sont pas redondantes chez <i>Trypanosoma brucei</i>	185
C2. L'inhibition de l'expression de TbHslV par ARN interférence entraîne des défauts de réplication/ ségrégation de l'ADN du kinétoplaste.	185

CHAPITRE 2	191
Exploration fonctionnelle de protéines mitochondriales par ARN interférence semi-systématique chez <i>T. brucei</i>.	191
A. Présentation de l'article 2 : Importante diversité de protéines mitochondriales impliquées dans le cycle cellulaire de <i>T. brucei</i>.	195
B. Publication (manuscrit en préparation)	195
CONCLUSION DES CHAPITRES 1 ET 2.....	219
DISCUSSION	225
MATERIELS ET METHODES	247
A. Souches et conditions de culture	249
A.1 : Souche Friedlin de <i>Leishmania major</i>	249
A.2 : Souche de <i>Trypanosoma brucei</i> , formes procycliques	249
A.3 : Souche de <i>Trypanosoma brucei</i> , formes sanguines.....	251
B. Manipulation des Leishmanies	251
B.1 : Construction des vecteurs d'expression des protéines fusionnées à la GFP : pTH _{6n} GFPc et pTH _{6c} GFPn	251
B.2 : Transfection par électroporation.....	253
C. Manipulation des Trypanosomes	255
C.1 : Construction des lignées cellulaires de <i>T. brucei</i> exprimant des protéines de fusion –GFP ou C-Myc.....	255
C.2 : Technique d'invalidation de l'expression des gènes par ARN interférence	257
C.3 : Transfection des cellules procycliques par électroporation	259
C.4 : Transfection des cellules sanguines par nucléofection	259
D. Northern blot	261
D.1 : Préparation d'extraits d'ARN de trypanosomes	261
D.2 : Northern blot	261
E. Western blot	263
E.1 : Préparation d'extraits protéiques de trypanosomes.....	263
E.2 : Western blot.....	263
F. Microscopie et imagerie par fluorescence	265
F.1 : Localisation intracellulaire par fluorescence.....	265
F.2 : Détection par immunofluorescence.....	265
F.3 : Marquage spécifique de la mitochondrie au MitoTracker	267

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Classification phylogénétique des leishmanies.....	40
Tableau 1 : Principales espèces de <i>Leishmania</i> associées aux différentes formes cliniques de leishmanioses.....	44
Figure 2 : Répartition géographique des leishmanioses cutanées (haut) et viscérales (bas) dans le monde	46
Tableau 2 : Morbidité des maladies infectieuses et parasitaires, dans le monde et par région, 2001	48
Tableau 3 : Médicaments utilisés contre les leishmanioses.	50
Figure 3 : Photographie d'un plébotome	51
Figure 4 : Cycle de vie de <i>Leishmania</i>	52
Figure 5 : Répartition géographique de la trypanosomiase humaine Africaine (THA)..	58
Tableau 4 : Traitements disponibles contre les trypanosomiasis humaines Africaines..	60
Figure 6 : Photo d'une mouche tsé-tsé ou glossine	63
Figure 7 : Cycle de vie de <i>Trypanosoma brucei</i>	64
Figure 8 : Changement de position du kinétoplaste pendant le cycle de vie de <i>T. brucei</i> .	66
Figure 9 : Arbre phylogénétique de Baldauf	68
Figure 11 : Architecture cellulaire du trypanosome	70
Figure 10 : Image en Microscopie à Balayage d'un trypanosome	71
Figure 12 : Evolution de la quantité d'ADN au cours du cycle cellulaire.....	84
Figure 13 : Image d'un Trypanosome en division cellulaire.....	89
Figure 14 : Représentation schématique des événements morphologiques majeurs du cycle cellulaire de <i>T. brucei</i>	90
Figure 15 : le cycle cellulaire des promastigotes de <i>L. mexicana</i>	92
Figure 16 : Promastigotes de <i>L. mexicana</i> par microscopie électronique à balayage.....	94
Figure 17 : Représentation schématique du cycle cellulaire des promastigotes de <i>L. major</i>	96
Tableau 5 : Durée des événements nucléaires du cycle cellulaire chez <i>L. major</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>T. brucei</i> et <i>T. cruzi</i>	97
Figure 18 : Timing des différentes phases du cycle cellulaire des promastigotes de <i>L. major</i>	98

<u>Figure 19</u> : Images par microscope électronique à balayage des cellules de <i>T. brucei</i> et de <i>L. major</i> en phase G1 et en cytotérière.....	100
<u>Figure 20</u> : Représentation schématique montrant les réponses différentes des formes procycliques et sanguines de <i>T. brucei</i> à un arrêt en G2/M.....	102
<u>Tableau 6</u> : Principaux points de contrôle du cycle cellulaire dans les formes sanguines et procycliques de <i>T. brucei</i>	104
<u>Tableau 7</u> : Distribution des protéases ATP-dépendantes	112
<u>Figure 21</u> : Structure du protéasome 20S	120
<u>Figure 22</u> : Représentation en coupe de la structure du complexe 20S-11S	124
<u>Figure 23</u> : Protéasome 20S associé à ses différents activateurs	124
<u>Figure 24</u> : Reconstruction de la structure du protéasome 26S.....	128
<u>Figure 25</u> : Organisation supposée du couvercle du 19S	130
<u>Figure 26</u> : Etapes de la dégradation des substrats ubiquitylés par le protéasome 26S	132
<u>Figure 27</u> : Structure du complexe HslVU chez <i>E. coli</i>	138
<u>Figure 28</u> : Tests de complémentation de TbHslU2 par TbHslU1 (T300) et de TbHslU1 par TbHslU2 (T301).....	184
<u>Figure 29</u> : Variation des phénotypes au cours du temps après RNAi-TbHslV.....	186
<u>Figure 30</u> : Variation au cours du temps de la taille des filaments reliant les kinétoplastes.....	188
<u>Figure 31</u> : Variation de la taille des kinétoplastes durant les 5 premiers jours d'induction de RNAi-TbHslV	189
<u>Figure 32</u> : Vecteurs intégrés dans la lignée 29-13 de <i>T. brucei</i>	251

**RESUME /
ABSTRACT**

Résumé

Leishmania et *Trypanosoma brucei* sont des protozoaires parasites responsables de graves parasitoses de distribution mondiale. Aucun vaccin n'est disponible contre ces maladies dont le traitement reste basé sur un nombre limité de médicaments coûteux, souvent toxiques et peu efficaces, problème auquel s'ajoute celui des chimiorésistances. D'où l'urgente nécessité de trouver de nouvelles cibles pour le développement de nouveaux traitements qui soient à la fois efficaces, non ou moins toxiques et à un coût plus accessible.

Les Trypanosomatidés, dont les génomes ont été entièrement séquencés, présentent de nombreuses originalités dans leur biologie cellulaire et moléculaire, par exemple un ADN mitochondrial unique et extrêmement complexe appelé kinétoplaste. Leur développement suit également un "double" cycle cellulaire répliquant, d'une part, classiquement le noyau et, d'autre part, l'ensemble "corps basal-ADN mitochondrial" dont la ségrégation correcte conditionne la cytodivision. Ils possèdent par ailleurs deux types de protéasomes, un classique (26S) et un de type procaryote, plus spécifique et absent chez l'homme, le complexe HsIVU. Nous avons montré que HsIVU est localisé exclusivement dans l'unique mitochondrie des parasites, et qu'il est, chez *T. brucei*, essentiel pour la survie de ces organismes. En effet, son inhibition par ARN interférence entraîne un blocage de la cytodivision suivi par une mort cellulaire. Le premier objectif de cette thèse a été de tenter de mieux comprendre le rôle de HsIVU dans le cycle cellulaire associé au kinétoplaste chez ces parasites possédant déjà un protéasome classique. Mettant un terme à plusieurs publications contradictoires, nous avons confirmé la localisation mitochondriale de ce complexe chez *Leishmania* et chez *T. brucei*. Nous montrons pour la première fois qu'il est tout aussi essentiel dans les formes sanguines, celles présentes chez l'hôte mammifère, que dans les formes procycliques. Nous montrons aussi un rôle différencié des différentes sous-unités du complexe dans le déroulement du cycle cellulaire associé au kinétoplaste.

Le deuxième objectif de cette thèse a été d'identifier de nouvelles protéines mitochondriales régulatrices du cycle cellulaire associé au kinétoplaste. Pour ce faire, nous avons développé une approche de criblage par ARN interférence "semi-systématique" sur 104 protéines mitochondriales, principalement de fonction inconnue. Si l'inhibition de l'expression de la majorité de ces protéines (62) n'a aucun effet sur la croissance cellulaire, celle des 42 restantes induit une baisse moyenne ou sévère de cette croissance. De façon surprenante, cette inhibition modifie significativement et avec plus ou moins d'ampleur le déroulement du cycle cellulaire, suggérant qu'il est dépendant de multiples fonctions cellulaires.

Finally, this work validates the HslVU proteasome as a relevant therapeutic target particularly for the blood forms of *T. brucei*. The functional differentiation of HslU1 and HslU2 and the independent activity of HslV give a more complex picture of the functioning of this proteasome. The RNA interference data for their part orient us towards a regulation of the cell cycle very integrated with the ensemble of cellular activities.

Mots-clés : *Leishmania*, *Trypanosoma brucei*, proteasome HslVU, mitochondrie, ARN interférence, cycle cellulaire.

Abstract

Leishmania and *Trypanosoma brucei* are protozoan parasites responsible for worldwide distributed severe diseases. No vaccine is available and the treatment relies upon a limited number of drugs, which are costly, often toxic and not highly efficient, and for which resistances are increasing. Hence the necessity to urgently discover novel drug targets with the aim of developing new drug treatments which would be more efficient, less toxic and if possible cheaper.

Trypanosomatids, of which the genome has been entirely sequenced, exhibit numerous peculiarities in their cell and molecular biology, for example a single and complex mitochondrial DNA network termed kinetoplast. Also, their development follows a ‘double’ cell cycle ensuring the replication of, on the one hand, the nucleus (classical mitosis) and on the other hand, the “basal body-kinetoplast” whole, of which the correct segregation conditions cytokinesis. They also possess two types of proteasomes, one classical one (26S) and one of the prokaryotic type, more specific and absent in human, the HslVU complex. We have shown that HslVU is located exclusively in the single mitochondrion of these parasites and, in *T. brucei*, that it is essential to parasite’s survival. Indeed, its RNA interference-based knockdown leads to a cytokinesis block followed by cell death. The first aim of this work was to try to better understand the role of HslVU in the ‘kinetoplast-associated’ cell cycle in these parasites that already possess a classical proteasome. Putting an end to several contradictory publications, we confirmed the mitochondrial location of this complex in *Leishmania* and *T. brucei*. For the first time, we also demonstrate that it is just as essential in bloodstream forms (those present in the mammalian host) than in procyclic forms. We finally show a differentiated role for the different subunits of the complex in the progress of the kinetoplast-associated cell cycle.

The second aim of this work was to identify novel mitochondrial proteins which would participate in the regulation of the kinetoplast-associated cell cycle. To do this, we developed a 'semi-systematic' screening approach using RNA interference for 104 mitochondrial proteins, most of them being of unknown function. If the inhibition of most of these proteins (64) had no effect on cell growth, that of the 42 remaining ones induced a moderate or severe growth defect. Surprisingly, this inhibition yielded significant and more or less visible modifications of the cell cycle progress, suggesting that the latter is dependent upon multiple cell functions.

Finally, this study validates the HslVU proteasome as a pertinent drug target, particularly for the bloodstream forms of *T. brucei*. The functional differentiation of HslU1 and HslU2 and the independent activity of HslV are intriguing and give a complex picture of the functioning of this proteasome. On the other hand, the RNA interference data suggest a cell cycle regulation which would be highly integrated to the whole of the cell activities.

Keywords : *Leishmania*, *Trypanosoma brucei*, proteasome HslVU, mitochondrion, RNA interference, cell cycle.

ABBREVIATIONS

ADN : Acide Désoxiribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
ARNi : ARN interférence
ARNm : ARN messenger
ATP : Adénosine TriPhosphate
BSF : Bloodstream form
CDK: Cyclin Dependent Kinase
CRK: Cdc2 Related Kinase
COMT: Centre Organisateur de Microtubules
CYC: Cycline
DAPI: 4',6'-diamidino-2-phénylindole
F : Flagelle
FAZ: Flagellum Attachment Zone
FC: Flagella Connector
GFP : Green Fluorescent Protein
GPI : Glycosyl-phosphatidylinositol
GIPL : Glycoinositol Phospholipide
IF : Immunofluorescence
K : kinétoplaste
Kb : Kilobase
kDa : kilo Dalton
LC : Leishmaniose Cutanée
LCM : Leishmaniose Cutané-Muqueuse
LPG : Lipophosphoglycan
LV : Leishmaniose Viscérale
N : Noyau
PA : Proteasome Activator
PCR : polymerase Chain Reaction
PFR : Paraflagellar Rod
PGPH : PeptidylGlutamyl Peptide-Hydrolyzing
VSG : Variant Surface Glycoprotein

INTRODUCTION

GENERALE

Au cours de ce travail de thèse, j'ai essayé de répondre principalement à deux questions. La première était de mieux comprendre quel pouvait être le rôle du protéasome mitochondrial d'origine bactérienne, HslVU, chez les Trypanosomatidés, parasites unicellulaires eucaryotes possédant déjà un protéasome classique (le 26S). La deuxième question était de déterminer l'implication d'un certain nombre de protéines mitochondriales dans le déroulement du cycle cellulaire, particulièrement la partie du cycle cellulaire qui assure la réplication et la ségrégation de l'ADN mitochondrial unique, aussi appelé kinétoplaste, et contrôle également la duplication du corps basal et du flagelle ainsi que la cytodivision. Ces deux questions, qui se rejoignent sur le cycle cellulaire du parasite, constituent les deux grands chapitres de cette thèse.

L'étude du complexe HslVU a été motivée par un certain nombre d'éléments.

Le protéasome classique eucaryote (26S) est une machinerie protéolytique responsable en particulier de la dégradation régulée de nombreuses protéines contrôlant des processus cellulaires essentiels tels que le cycle cellulaire. HslVU, quant à lui, est un complexe protéasique présent chez les Eubactéries et apparenté au protéasome eucaryote par son mode de clivage, sa structure générale et son rôle dans la dégradation des protéines anormales ou malformées. Or, à la suite des projets de séquençage systématique des génomes de protozoaires parasites dans les années 2000, qui ont mis en évidence les gènes correspondants, ce complexe a également été retrouvé chez plusieurs de ces eucaryotes unicellulaires, où il co-existe avec le protéasome classique. Ainsi, contrairement au dogme établi qui suggérait que HslVU et le protéasome 26S étaient mutuellement incompatibles chez un même organisme (De Mot *et al.*, 1999, Ruiz-Gonzalez *et al.*, 2006), il est aujourd'hui prouvé que des protistes tels que les Trypanosomatidés *Leishmania* et *Trypanosoma*, ou les Apicomplexes tels que *Plasmodium* possèdent les deux types de protéasomes. De façon intéressante, la localisation prédite du complexe étant mitochondriale, les gènes de HslVU ont probablement été acquis par transfert horizontal d'une protéobactérie endosymbiotique.

La présence d'un complexe HslVU chez ces organismes possédant par ailleurs un protéasome eucaryote parfaitement fonctionnel, intrigue. On ne peut s'empêcher de tenter de la mettre en corrélation avec les nombreuses spécificités de la biologie de ces parasites considérés comme « ancestraux » ou en tout cas largement « divergents » par rapport aux modèles classiquement étudiés (Homme, Souris, Levure, Drosophile...) appartenant tous aux Opisthochontes. Par exemple, *Leishmania* et *Trypanosoma brucei* présentent une mitochondrie unique, contenant un réseau dense et complexe d'ADN mitochondrial appelé kinétoplaste. Le développement de

ces parasites suit par ailleurs un "double" cycle cellulaire, l'un classiquement associé au noyau et à la mitose, l'autre associé à la mitochondrie et à la duplication du corps basal et du kinétoplaste. De façon surprenante, les cycles de réplication du kinétoplaste et du noyau sont en grande partie indépendants, bien que strictement synchronisés, et la cytodivision apparaît dépendre de la duplication correcte du kinétoplaste et non du déroulement normal de la mitose (nucléaire).

Par ailleurs, pour un grand nombre de gènes, l'absence de promoteur pour la RNA polymérase II limite la régulation transcriptionnelle, ce qui laisse, outre les régulations de type épigénétique, une grande place aux processus de régulation traductionnels et post-traductionnels dans le contrôle de l'expression génique.

Ainsi, la co-existence, au niveau de la mitochondrie, du "protéasome" HslVU et de processus complexes et spécifiques associés au kinétoplaste et à la cytodivision, a poussé mon équipe d'accueil à poser l'hypothèse générale d'une régulation par HslVU de protéines associées à un "cycle cellulaire mitochondrial" encore mal élucidé.

La première étape de ce travail a été de déterminer la localisation intracellulaire des protéines du complexe HslVU chez *L. major* et *T. brucei*. Ensuite, afin de comprendre sa fonction dans la cellule, nous avons utilisé la technique d'ARN interférence, une technique d'inactivation de gènes non fonctionnelle chez *L. major* mais très efficace chez *T. brucei*. Au tout début de notre travail, une autre équipe publiait des résultats déjà avancés sur le sujet chez *T. brucei*, mettant à mal le projet de publication de nos résultats. Toutefois, un examen approfondi de leurs résultats révélait un certain nombre de contradictions avec les nôtres. Nous avons donc décidé de poursuivre le projet, et dans un premier temps, de réaliser un nombre important d'expériences complémentaires visant à s'assurer de la pertinence de nos résultats. La reproductibilité de ceux-ci nous permet aujourd'hui de discuter les différences observées. La publication au début de l'année 2012 d'une étude sur HslVU chez *L. donovani*, venant encore contredire les résultats précédemment publiés, a rajouté davantage d'intérêt à la publication de nos données.

Les travaux présentés ici permettent de définitivement clore les questions soulevées par ces études contradictoires, et de clairement affirmer et préciser le rôle direct ou indirect du complexe HslVU dans le déroulement du cycle cellulaire chez les Trypanosomatidés. De plus, l'étude fonctionnelle de cette protéase dans les formes sanguines de *T. brucei*, formes présentes chez l'hôte mammifère, ajoute de la pertinence à sa validation comme cible thérapeutique potentielle.

La compréhension du rôle de HslVU chez les Trypanosomatidés doit passer également par la connaissance (i) de ses partenaires éventuels et (ii) de ses substrats protéiques. Dans ce sens, nous avons entrepris en deuxième année de thèse une recherche de partenaires et/ou substrats du complexe par la technique du double-hybride en levures, utilisant une banque de cDNA de protéines proies chez *L. major*. Malheureusement, cette approche n'a pas fourni de résultats exploitables, et cette partie du travail ne sera donc pas présentée dans la thèse.

Une approche indirecte a alors été choisie, susceptible de donner des résultats à la fois au niveau des substrats du complexe et, plus généralement surtout, de protéines participant au cycle cellulaire "associé au kinétoplaste". Cette approche a consisté en une exploration fonctionnelle de protéines mitochondriales putatives, majoritairement de fonction inconnue, par ARN interférence chez *Trypanosoma brucei*.

En effet, si la mitochondrie est connue classiquement pour assurer les ressources énergétiques de la cellule, elle est aussi, comme nous l'avons dit plus haut, et de façon originale, directement impliquée dans le bon déroulement du cycle cellulaire chez ces organismes. Notre approche "semi-systématique" a recherché des effets phénotypiques facilement caractérisables lors de l'inhibition de certaines de ces protéines, afin d'identifier des protéines qui seraient directement ou indirectement impliquées dans le déroulement normal du cycle cellulaire, particulièrement le cycle cellulaire associé à la duplication/ségrégation du kinétoplaste et à la cytodierèse. Un certain nombre de nos résultats s'opposent à des données établies par des approches globales de grande ampleur. En effet, nous mettons en évidence qu'une majorité des protéines ciblées (60%) n'ont, dans nos conditions de culture de ce stade procyclique, aucune influence sur la croissance cellulaire. De façon inattendue, les 40% restantes agissant sur la croissance cellulaire modifient substantiellement le déroulement du cycle cellulaire. Ce point suggère que ce cycle est directement ou indirectement dépendant de l'équilibre de l'ensemble des fonctions cellulaires.

Enfin, en conclusion de cette introduction, il est important de rappeler que le complexe HslVU constitue, de par sa spécificité et sa "crucialité" chez les Trypanosomatidés, une cible thérapeutique potentielle contre ces parasites. Ainsi, ce projet de meilleure compréhension du rôle de HslVU s'inscrit dans le cadre d'un projet plus vaste et collaboratif visant à développer des inhibiteurs du complexe, et associant des biochimistes spécialistes du protéasome, des chimistes et des biologistes structuraux. Ces aspects ne font toutefois pas l'objet de mon travail et ne seront donc pas abordés dans ce mémoire.

REVUE DE LA LITTERATURE

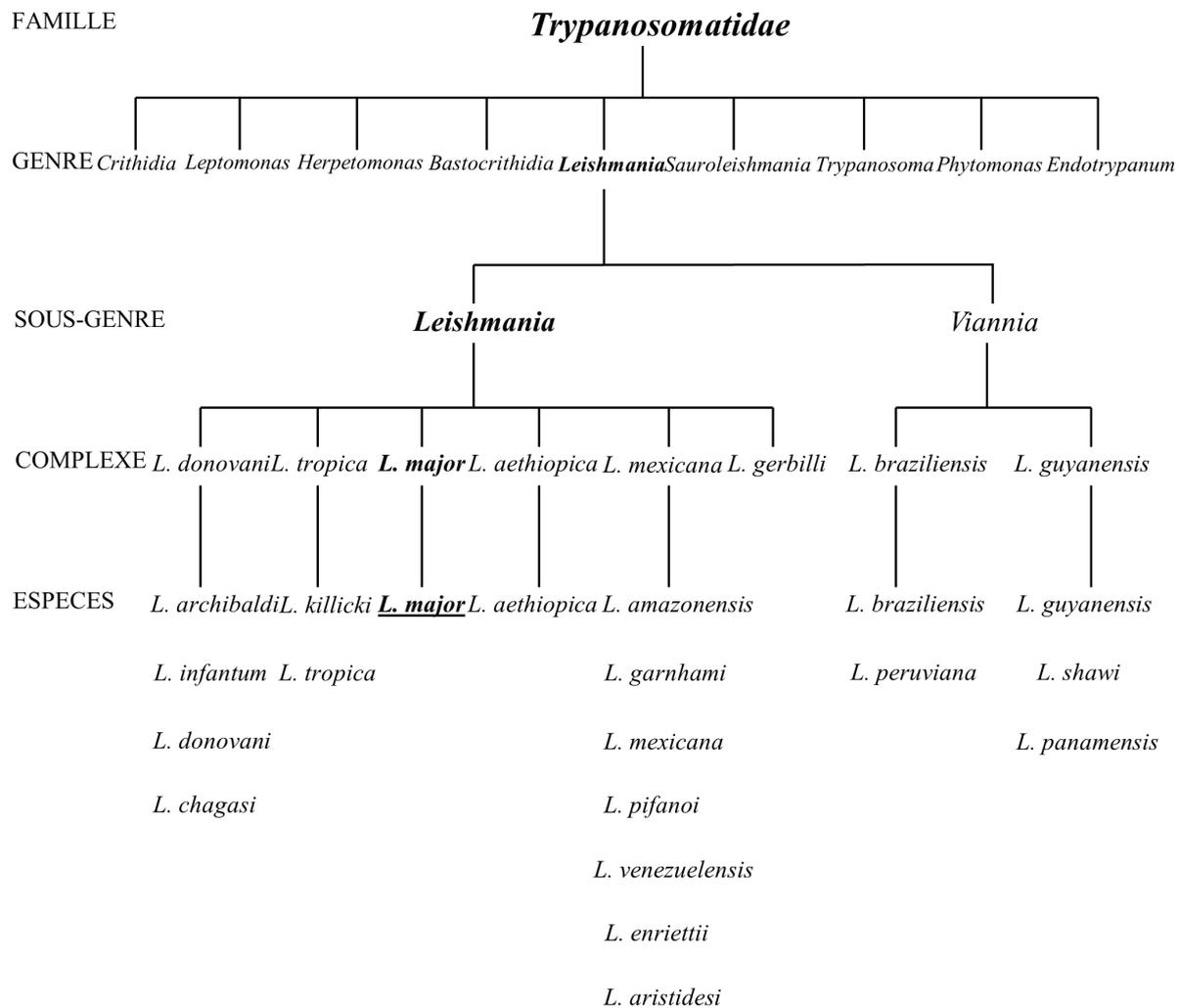


Figure 1 : Classification phylogénétique des leishmanies

Classification de Lainson & Shaw, 1987, adaptée de Pratlong & Lanotte p.21-39 dans « Les leishmanioses » de JP Dedet (Edition ELLIPSES AUPELF/UREF, 1999).

En gras et souligné, l'espèce utilisée au cours de cette thèse.

A -L'Ordre des Kinétoplastida.

Les Kinétoplastida sont des protozoaires flagellés qui possèdent, dans leur mitochondrie unique, un ADN mitochondrial très concentré et circulaire, visible en microscopie optique à la base du flagelle. C'est la dénomination de cette structure par Alexeieff ("kinétoplaste") qui donna leur nom à ce groupe de parasites (Alexeieff, 1917). L'analyse par microscopie électronique a confirmé la présence dans la mitochondrie d'une quantité très importante d'ADN mitochondrial très condensé (Vickerman, 1969). Le kinétoplaste est ainsi facilement visible après coloration au Giemsa ou en fluorescence avec des marqueurs de l'ADN comme le DAPI. Les organismes appartenant à ce groupe furent classés dans la Classe des Kinetoplastea, Ordre des Kinétoplastida (Levine *et al.*, 1980, Cavalier-Smith, 1993, Haag *et al.*, 1998), appartenant à l'Embranchement des Euglenozoa. Ce classement fut confirmé par de nombreux travaux phylogénétiques sur l'ADN ribosomique montrant que la branche des Euglenozoa est un groupe monophylétique à part qui a divergé très tôt de la branche principale des Eucaryotes (Maslov *et al.*, 1999). L'Ordre des Kinetoplastida est subdivisé en deux sous-ordres: les Bodonida et les Trypanosomida (Cavalier-Smith, 1993). Ces derniers comprennent des organismes exclusivement parasites dotés d'un seul flagelle. Ils parasitent toutes les classes de vertébrés, certains insectes et certaines plantes (Maslov *et al.*, 2001). A noter que dans la classification plus récente de Baldauf (Baldauf, 2003), basée sur des données de phylogénie moléculaire, ces organismes font partie de la branche des Discicristates.

Trois types de Trypanosomatidés sont pathogènes pour l'Homme : *Trypanosoma brucei* (responsable de la maladie du sommeil), *Trypanosoma cruzi* (responsable de la maladie de Chagas) et *Leishmania sp.* (responsable des leishmanioses).

Le genre *Leishmania* est divisé en deux sous-genres : *Leishmania* et *Viannia*, chacun des deux sous-genres étant subdivisé en complexes phylogénétiques généralement appelés "espèces" et associés à des caractéristiques cliniques et bio-géographiques (Rioux *et al.*, 1990, Dedet, 1999) (cf. Fig. 1).

Les Trypanosomes sont subdivisés en Stercoraria ou trypanosomes américains, transmis via les fèces d'un insecte vecteur (ex : *Trypanosoma cruzi*), et Salivaria ou trypanosomes

africains, transmis via la salive du vecteur (ex : *Trypanosoma brucei*). Ces différentes espèces de trypanosomes, aux cycles extrêmement différents, affectent divers animaux et/ou l'Homme : *Trypanosoma cruzi* est responsable chez l'Homme de la maladie de Chagas (ou trypanosomiase humaine américaine) que nous n'aborderons pas ici, et *Trypanosoma brucei* est l'agent causal, chez l'Homme, de la fameuse "maladie du sommeil" (ou trypanosomiase humaine africaine) et, chez le bétail, de la Nagana.

B. *Leishmania* et leishmanioses.

B1. Les leishmanioses

Les leishmanioses sont des parasitoses dues à l'infection de l'homme par un protozoaire flagellé appartenant au genre *Leishmania*. Parasites principalement zoonotiques, les *Leishmania* affectent de très nombreuses espèces de mammifères domestiques ou sauvages et sont transmis dans la nature par la piqûre infectante du phlébotome vecteur. Il n'existe pas moins d'une vingtaine d'espèces pathogènes pour l'homme, chez lequel elles déterminent des tableaux cliniques variés.

B1.1. Historique

Parmi les historiques de toutes les parasitoses, celui des leishmanioses est un de ceux qui remontent au plus loin dans le temps. En effet, si la constatation des lésions cutanées de ces affections remonte à la plus haute Antiquité, l'individualisation des formes viscérales et la mise en évidence des agents pathogènes ne s'effectueront quant à elles qu'au XIX^e siècle ((Dedet, 1999) : voir Jarry D.M). Ainsi, des représentations de lésions de la peau et de déformations du visage typiques des leishmanioses ont été trouvées sur des poteries pré-incas de l'Equateur et du Pérou, datant du premier siècle avant JC. Le genre *Leishmania* a été créé par Sir Donald Ross en 1903 suite aux études menées par Leishman et Donovan en 1900 qui observèrent des « petits corps ovales » dans des préparations de rate issues de patients atteints de kala-azar en Inde (Bailey *et al.*, 1959). Nicolle et Sicre ont ensuite fait l'analogie entre cet organisme responsable du kala-azar et celui qui induit le bouton d'Orient. En ce qui concerne les leishmanioses du Nouveau Monde, ce sont Chagas et Vianna qui identifièrent, les premiers, les parasites responsables (1911). A la même époque, les premiers traitements à

	Leishmaniose cutanée	Leishmaniose cutanéomuqueuse	Leishmaniose viscérale
Principales formes cliniques	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. infantum</i> ^a <i>L. shawi</i> ^a <i>L. naiffi</i> ^a <i>L. lainsoni</i> ^a <i>L. donovani</i> ^b	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i> ^a <i>L. amazonensis</i> ^a <i>L. guyanensis</i> ^b	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum/chagasi</i> <i>L. tropica</i> ^b
Formes particulières de la maladie cutanée	<i>L. donovani</i> : PKDL <i>L. mexicana</i> : 'ulcère des chicleros' <i>L. peruviana</i> : 'uta' <i>L. guyanensis</i> : 'Pian bois' <i>L. aethiopica</i> ^a , <i>L. mexicana</i> ^a , <i>L. amazonensis</i> ^a : DCL <i>L. tropica</i> ^a , <i>L. aethiopica</i> ^a , <i>L. braziliensis</i> ^b , <i>L. panamensis</i> ^b , <i>L. guyanensis</i> ^b , <i>L. amazonensis</i> ^b : leishmaniose récidivante et disséminée		
Patients immunodéprimés (essentiellement les patients VIH positifs)	La plupart des espèces	<i>L. donovani</i> ^a <i>L. infantum</i> ^{b,c} <i>L. major</i> ^{b,d} <i>L. guyanensis</i> ^b <i>L. amazonensis</i> ^b	<i>L. infantum</i> ^c <i>L. braziliensis</i> ^b <i>L. mexicana</i> ^b <i>L. amazonensis</i> ^b
DLC, leishmaniose cutanée disséminée; VIH, Virus de l'Immunodéficience Humaine; PKDL, leishmaniose cutanée post kala-azar ; ^a Rarement. ^b Exceptionnellement. ^c Y compris les zymodèmes 'dermatropes'. ^d Extension locale à la muqueuse. <i>Les références bibliographiques peuvent être trouvées dans (Banuls et al., 2011).</i>			

Tableau 1 : Principales espèces de Leishmania associées aux différentes formes cliniques de leishmanioses. (Adapté de Banuls et al., 2011)

base d'antimoine étaient découverts. Enfin, en 1921, les frères Sargent ont apporté la preuve du rôle vecteur du phlébotome dans les leishmanioses (Sargent *et al.*, 1921).

B1.2. Formes cliniques des leishmanioses

Trois grandes formes cliniques de leishmanioses existent chez l'Homme : la leishmaniose cutanée (LC), la leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) et la leishmaniose viscérale (LV), avec toutefois un grand polymorphisme clinique surtout pour les formes cutanées (pour revue : (Banuls *et al.*, 2011)).

La leishmaniose cutanée est caractérisée par une ou des lésions d'aspect polymorphe et d'évolution lente, chronique, indolore, classiquement sans signes généraux, sans lésion muqueuse ni viscérale. Elle débute par une papule prurigineuse et évolue généralement vers une ulcération. La ou les lésions sont localisées à l'endroit de la piqûre, c'est-à-dire le plus souvent sur les régions découvertes (visage, membres...). On distingue la leishmaniose cutanée localisée, qui guérit spontanément au bout de quelques mois ou années d'évolution mais au prix d'une cicatrice indélébile, de la leishmaniose cutanée diffuse qui ne guérit jamais spontanément, difficile à traiter, et qui présente une tendance aux rechutes après le traitement. Dans l'Ancien Monde, la leishmaniose cutanée, ou bouton d'Orient, a de nombreux synonymes : bouton d'Alep, de Biskra, de Delhi, de Samarkande, de Tachkent, ulcère du Caire ou de Pendeh... Cette forme est endémique dans tout le Bassin Méditerranéen, en Asie Centrale, en Afrique Occidentale et Centrale. On retrouve également la leishmaniose cutanée dans toute l'Amérique Latine, dans les régions de forêt dense humide notamment.

La leishmaniose cutanéomuqueuse, aussi appelée « *espundia* », provoque des lésions pouvant conduire à une destruction partielle ou totale des muqueuses du nez, de la bouche et de la gorge. Ces lésions défigurantes entraînent souvent l'humiliation et l'exclusion de la société des personnes atteintes. Cette maladie est essentiellement retrouvée en Amérique du Sud et Centrale. Il s'agit d'une extension métastatique de lésions cutanées (essentiellement dues à une espèce, *L. braziliensis*) survenues des années auparavant.

La leishmaniose viscérale, également appelée « *kala-azar* » (fièvre noire, ou fièvre « *dumdum* »), est la forme la plus grave de leishmaniose. Elle sévit surtout en Asie (Inde, Bangladesh, Népal), en Afrique (Ethiopie, Kenya, Soudan) et en Amérique du Sud (Brésil). Elle est également présente sur le pourtour du Bassin Méditerranéen, et en particularité dans le sud de l'Europe. Elle se caractérise par des poussées de fièvre irrégulières, une perte de poids, une hépatosplénomégalie et une anémie. En l'absence de traitement, la mort survient après un déclin de l'état général, par cachexie. De plus, les co-infections SIDA/leishmaniose

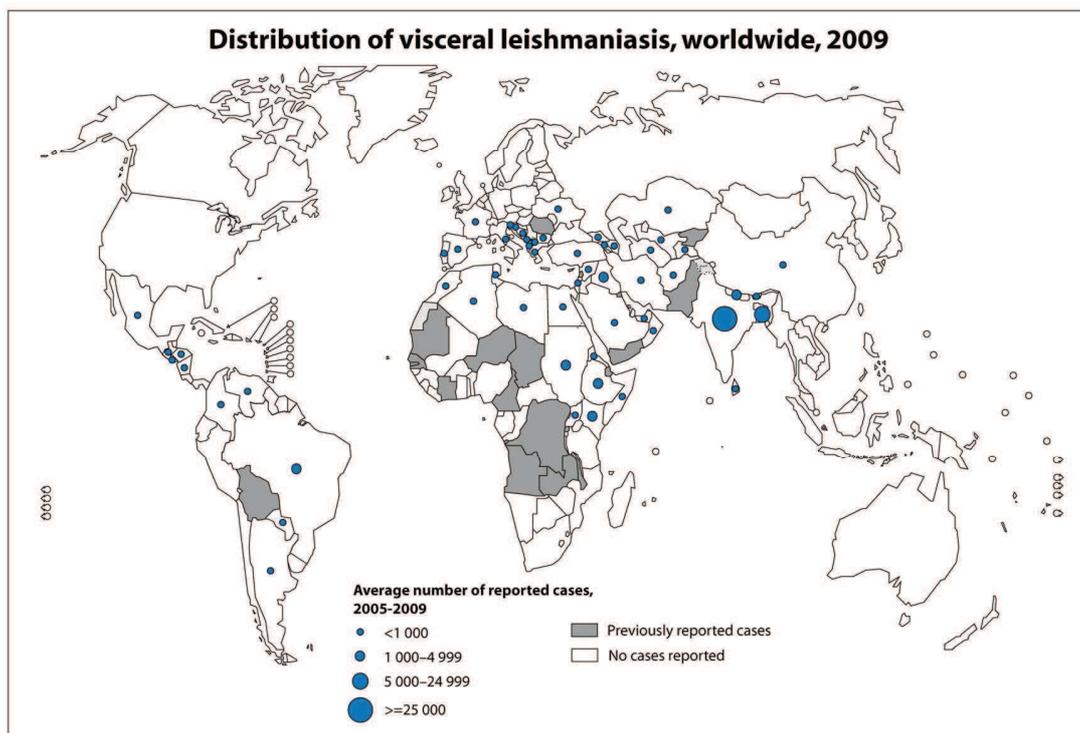
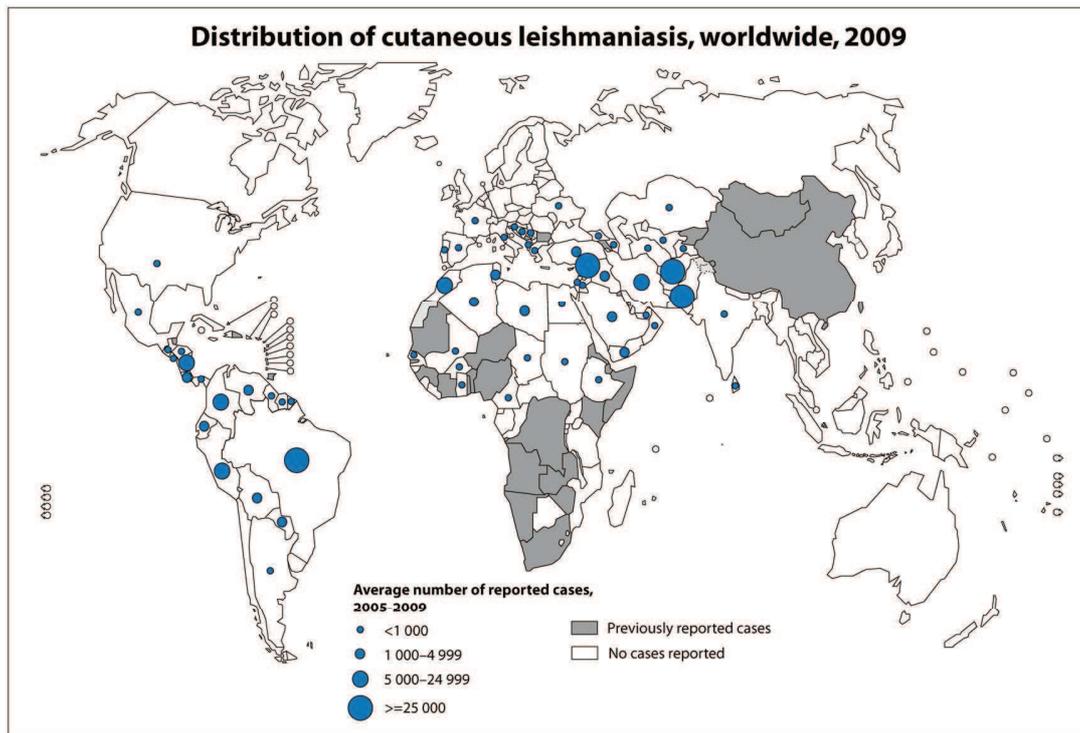


Figure 2 : Répartition géographique des leishmanioses cutanées (haut) et viscérales (bas) dans le monde. Les leishmanioses sont répandues sur 98 pays et trois territoires sur 5 continents.

(http://gamapservet.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_leishmaniasis_cutaneous_2009.png) et

(http://gamapservet.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_leishmaniasis_visceral_2009.png)

viscérale, de plus en plus fréquentes en raison de l'extension de l'épidémie de SIDA, sont devenues un problème de santé publique.

Les différentes formes de leishmanioses sont dues à différentes espèces de leishmanies. Le Tableau 1 regroupe les principales espèces de leishmanies associées à différentes formes cliniques de leishmanioses.

B1.3. Localisation géographique et prévalence

Considérées par l'Organisation Mondiale de la Santé comme une des maladies prioritaires du programme 'Tropical Diseases Research', les leishmanioses sont répandues sur un total de 98 pays et trois territoires sur 5 continents (cf. Fig. 2). D'après une étude portant sur l'incidence des leishmanioses au cours des 5 dernières années dans le monde (Alvar *et al.*, 2012), on estime qu'environ 0,2 à 0,4 millions de cas de leishmanioses viscérales (LV) et 0,7 à 1,2 millions de cas de leishmanioses cutanées (LC) surviennent chaque année dans le monde. Plus de 90% des cas mondiaux de LV se retrouvent dans seulement six pays : l'Inde, le Bangladesh, le Soudan, le Sud-Soudan, le Brésil et l'Éthiopie. La LC est plus largement répandue avec environ un tiers des cas survenant dans chacune des trois régions : les Amériques, le Bassin Méditerranéen et l'Asie occidentale, du Moyen-Orient à l'Asie centrale. Dix pays présentent le nombre de cas le plus élevé, l'Afghanistan, l'Algérie, la Colombie, le Brésil, l'Iran, la Syrie, l'Éthiopie, Soudan, le Costa Rica et le Pérou, qui représentant ensemble 70 à 75% de l'incidence mondiale estimée de LC.

La Leishmaniose est devenue dans certains pays un problème sanitaire d'urgence : c'est le cas notamment en Éthiopie, en Érythrée et au Soudan où la maladie est épidémique depuis plusieurs années. La maladie est par ailleurs responsable de la 9^{ème} plus grande morbidité mondiale parmi les maladies infectieuses (Hotez *et al.*, 2004, Alvar *et al.*, 2012) (cf. tableau 2). Considérant l'état clairsemé des données actuelles de mortalité, avec un taux de létalité global de 10% et en supposant que pratiquement tous les décès sont dus à des LV, l'estimation provisoire est de 20.000 à 40.000 décès par an dus aux leishmanioses, en conformité avec les estimations précédentes de l'O.M.S (Anonymous, 2008).

B1.4. Traitements

Malgré les efforts de la communauté scientifique, il n'existe pas de vaccin pour prévenir les leishmanioses, ni de médicament prophylactique, et la lutte antivectorielle demeure difficile et non efficace. La lutte antileishmanienne repose donc essentiellement sur la chimiothérapie (Buffet *et al.*, 2011).

Disease	Disease burden worldwide, DALYs in thousands (%) ^a	Disease burden by region, % ^b					
		Africa	Southeast Asia	East Mediterranean	Western Pacific	The Americas	Europe
HIV/AIDS	88,429 (6.0)	65.0	15.4	1.9	2.2	3.1	1.0
Diarrheal disease	65,451 (4.3)	32.9	34.2	16.5	6.3	4.3	1.3
Malaria	42,280 (2.9)	85.2	8.7	4.8	1.0	0.3	0.1
Tuberculosis	36,040 (2.5)	24.8	44.3	8.3	15.3	2.6	4.7
Measles	26,495 (1.8)	57.1	26.1	11.5	4.4	0.0	0.9
Sexually transmitted disease ^c	12,404 (0.8)	41.4	34.8	10.7	5.1	5.1	2.9
Lymphatic filariasis	5,644 (0.4)	34.2	49.6	8.7	7.2	0.2	0.03
Trachoma	3,997 (0.3)	38.2	6.2	15.1	40.6	0.0	0.0
Leishmaniasis	2,357 (0.2)	17.0	67.3	11.8	1.1	2.5	0.3
Hookworm disease ^d	1,825 (0.1)	23.3	45.7	9.0	13.6	8.2	0.0
Schistosomiasis	1,760 (0.1)	80.6	0.2	11.5	2.9	10.4	0.0
Trichuriasis ^d	1,649 (0.1)	7.5	26.0	2.2	46.6	17.7	0.0
African trypanosomiasis	1,598 (0.1)	97.4	0.0	2.5	0.0	0.0	0.0
Ascariasis ^d	1,181 (0.1)	10.2	22.8	5.2	46.4	14.6	0.7
Onchocerciasis	987 (0.1)	95.0	0.0	4.7	0.0	0.3	0.0
Japanese encephalitis	767 (0.1)	0.0	45.2	10.6	44.3	0.0	0.0
Dengue	653 (0.0)	0.9	55.1	13.0	17.2	13.8	0.0
Chagas disease	649 (0.0)	0.0	0.0	0.0	0.0	99.8	0.0
Leprosy	177 (0.0)	9.0	67.2	9.0	4.0	10.2	0.0
All infectious and parasitic diseases	359,377 (24.5)	52.6	26.2	9.7	6.4	3.5	1.6

Remarque : Les infections des voies respiratoires supérieures et inférieures et l'otite moyenne, la coqueluche, la poliomyélite, la diphtérie, le tétanos, la méningite et l'hépatite B et C ne sont pas inclus dans les données.

DALYs (en anglais : Disability-Adjusted Life Years): Espérance de vie ajustée sur l'invalidité

^aPourcentage du total des DALYs dans le monde pour toutes les maladies

^bPourcentage du total des DALYs dans le monde pour la maladie spécifiée

^cComprend la syphilis, la chlamydia et la gonorrhée

^dInfection par les nematodes intestinaux

Tableau 2 : Morbidité des maladies infectieuses et parasitaires, dans le monde et par région, 2001.

Adapté de (Hotez P J et al. Clin Infect Dis. 2004;38:871-878), d'après "World health report, 2002: reducing risks, promoting healthy life. Geneva, Switzerland: WHO; 2002. Annex table 3: burden of disease in DALYs by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2001; p. 192-7".

La thérapeutique des leishmanioses est dominée, depuis le début du siècle, par **les dérivés de l'antimoine** qui demeurent, encore de nos jours dans la plupart des pays endémiques, les médicaments de première intention. L'amphotéricine B (Ouellette *et al.*, 2004), surtout sous sa forme encapsulée dans des liposomes, tend à s'imposer en première intention dans les pays riches (en particulier au cours des immuno-dépressions) ou dans les cas de résistance, de plus en plus fréquente, aux antimoniés (leishmaniose cutanéomuqueuse, kala-azar est africain ou indien). Des traitements alternatifs existent mais reposent sur l'utilisation de composés aux mécanismes d'action peu voire pas connus. Enfin, **la miltéfosine** est actuellement commercialisée en Inde et en Allemagne, sous le nom d'Impavido®. Elle constitue le premier traitement oral contre les leishmanioses.

Le tableau 3 récapitule les principaux traitements disponibles et quelques-unes de leurs caractéristiques.

La pharmacologie des leishmanioses repose donc sur quelques drogues d'utilisation délicate compte tenu de leur toxicité, de la mauvaise connaissance de leur mécanisme d'action en général, de leur voie d'administration essentiellement parentérale et de l'apparition de souches résistantes. Ces drogues sont en outre, coûteuses, ce qui rend souvent problématique leur utilisation dans des populations de niveau socio-économique faible. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques et substances antileishmaniennes demeure donc primordial. L'une des approches possibles dans cette voie consiste à explorer et mieux comprendre la biologie du parasite et ses spécificités.

B2. Cycle de vie des leishmanies

B2.1. Hôtes et vecteur

Les *Leishmania* sont des parasites à deux hôtes: un hôte vertébré et un hôte insecte, ce dernier étant responsable de la transmission du pathogène et jouant ainsi le rôle de vecteur. Le vecteur de la leishmaniose est le phlébotome (cf. Fig.3), un diptère hématophage de petite taille (2 à 5mm), appartenant, dans la famille des *Psychodidae*, à la sous-famille des *Phlebotominae*. On peut compter jusqu'à 13 genres dans cette sous-famille, et parmi eux, seuls les genres *Lutzomyia* et *Phlebotomus* se trouvent impliqués dans l'épidémiologie des leishmanioses. Ils comportent de nombreux sous-genres plus ou moins spécifiques d'espèces de *Leishmania* (Lewis, 1971).

Médicament	Indication	Mode d'action sur le parasite	Commentaires
Dérivés de l'antimoine (Glucantime® et Pentostam®)	La majorité des leishmanioses	Mal compris	Faible coût ; effets secondaires importants ; augmentation résistance
Amphotéricine B	Leishmanioses résistantes aux antimoniés et co-infection leishmaniose viscérale/SIDA	Métabolisme des stéroïdes	Toxicité diminuée après encapsulation dans des liposomes ; onéreux
Pentamidine, aminosidine, allopurinol, dérivés imidazolés	Traitements alternatifs des leishmanioses	Métabolisme des polyamines, Mécanisme inconnu, Métabolisme des purines, Métabolisme des stéroïdes	Toxiques Peu efficace chez l'Homme
Miltéfosine (Impavido®)	Leishmaniose viscérale	Métabolisme des lipides	Analogue de la phosphocoline (anti-tumoral) ; administration par voie orale ; commercialisé seulement en Inde et en Allemagne

Tableau 3 : Médicaments utilisés contre les leishmanioses.

On peut remarquer que la plupart de ces médicaments ont des effets secondaires importants.



Figure 3: Photographie d'un plébotome.

Le phlébotome femelle, diptère hémaphage de 2 à 5mm, de la famille des Psychodidae et de la sous famille des Phlébotominae, est le vecteur des leishmanioses. (www.parasitologie.univ-montp1.fr/leish1.htm)

Les leishmanioses sont essentiellement des anthroponoses, ce qui signifie, qu'outre l'Homme, les leishmanies peuvent être retrouvées dans de nombreuses espèces de mammifères domestiques et sauvages. Parmi les animaux infectés, certains présentent les symptômes relatifs aux leishmanioses alors que d'autres ne semblent souffrir d'aucune maladie. Ces animaux constituent le réservoir d'infection pour les leishmanioses. Pour *L. tropica* et *L. donovani*, on ne connaît classiquement pas de réservoir animal.

B2.2. Stades de différenciation du parasite

Les leishmanies se présentent chez leurs hôtes successifs sous deux stades morphologiques principaux : les promastigotes et les amastigotes.

Les **promastigotes** sont des formes de vie extracellulaires, mobiles et retrouvées dans le tube digestif de l'insecte vecteur. Ce stade présente un corps plus ou moins fuselé, de 5 à 20 μ m de long pour une largeur de 1 à 4 μ m. Le corps cellulaire est prolongé par un flagelle qui peut atteindre les 20 μ m de long et qui émerge du pôle antérieur.

Les **amastigotes** quant à eux, nichent à l'intérieur des cellules du système réticulo-histiocytaire (classiquement les macrophages) des mammifères, au sein de vacuoles parasitophores. Les amastigotes ont un corps ovoïde d'environ 4 μ m de long et 2 μ m de large. Ces formes de vie, contrairement à ce qu'indique leur nom, possèdent également un flagelle mais celui-ci est très court et ne dépasse pas le corps cellulaire. Chaque cellule hôte peut héberger plusieurs dizaines d'amastigotes.

Etapes dans le vecteur insecte

Etapes dans l'hôte Mammifère

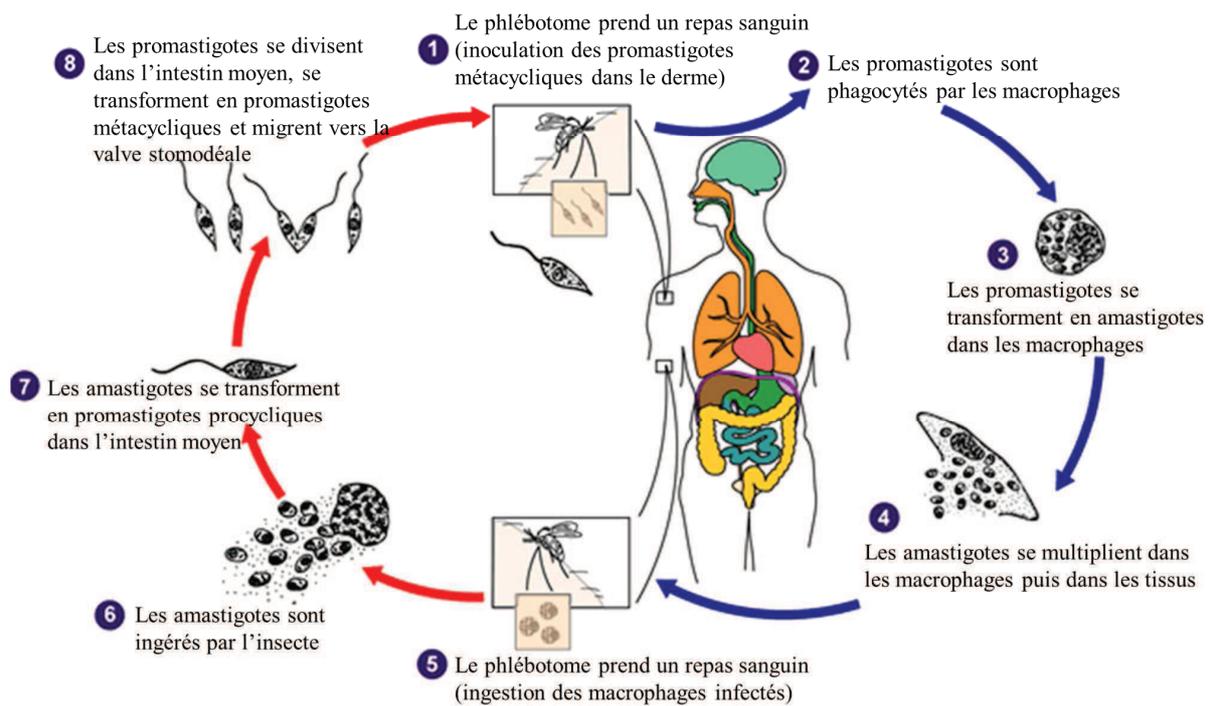


Figure 4 : Cycle de vie de Leishmania.

Les étapes 2, 3 et 4 se déroulent dans l'hôte Mammifère et les étapes 6, 7 et 8 dans le vecteur insecte. (Adapté de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>)

B2.3. Description du cycle biologique

Lors d'un repas sanguin sur l'hôte mammifère (cf. Fig 4), le phlébotome inocule dans le derme de l'hôte des formes promastigotes spécifiques, infectieuses (dites métacycliques) présentes dans ses pièces buccales. Ces promastigotes, qui échappent à l'action délétère du complément, vont se fixer sur les macrophages dermiques, lesquels vont les englober rapidement. Si, dans un premier temps, seuls les macrophages dermiques résidents sont infectés, d'autres monocytes/macrophages recrutés au niveau du site d'infection vont être progressivement envahis par les parasites. C'est par un processus de phagocytose que les macrophages vont ensuite internaliser les promastigotes liés. Le compartiment abritant les leishmanies, généralement formé à la périphérie des macrophages, migre vers le centre cellulaire. Migration au cours de laquelle ce compartiment va subir des modifications qui, par la suite, aboutiront à la formation d'organites connus sous le terme de vacuoles parasitophores. A l'intérieur des vacuoles parasitophores, les promastigotes se différencient en amastigotes adaptés à la vie intracellulaire. Puis, il se produit une fusion des phagosomes abritant des leishmanies avec les compartiments tardifs de la voie d'endocytose. Les amastigotes, adaptés à la vie dans les phagolysosomes, s'y multiplient, aboutissant à la lyse des phagocytes et libérant des amastigotes qui sont captés par les macrophages sains environnants (Sacks *et al.*, 2001).

Des observations plus récentes ont mené à l'hypothèse que les parasites atteignent leurs cellules hôtes définitives, les macrophages, par l'intermédiaire des granulocytes neutrophiles ou polynucléaires neutrophiles (PNN), premiers leucocytes circulants à migrer au site d'infection lors de la réponse inflammatoire. Il s'agit de l'hypothèse du « cheval de Troie », une stratégie d'évasion du système immunitaire permettant l'entrée « silencieuse » des promastigotes de *Leishmania* dans les macrophages. L'infection par les promastigotes de *L. major* conduit à un rapide recrutement des PNN *via* les chimiokines produites dans les tissus infectés et *via* la libération par les parasites du facteur chimiotactique de *Leishmania* (LCF). Les PNN phagocytent alors les parasites, et la sécrétion de l'IL-8 (Interleukine 8) par ces PNN infectés va amplifier la migration d'autres PNN au site d'infection. Après avoir été ingérés, les parasites survivent intracellulairement dans les PNN. L'infection par *L. major* va retarder l'apoptose spontanée des PNN infectés. Au cours de leur durée de vie prolongée, les PNN infectés libèrent une chimiokine attractive des monocytes : le MIP-1 β . Après deux jours, les PNN infectés vont devenir apoptotiques. Les monocytes, attirés par le MIP-1 β , sont ainsi recrutés au site d'infection et vont ingérer les « chevaux de Troie » (PNN apoptotiques abritant des parasites vivants). L'absorption de PNN apoptotiques éteint les fonctions

antimicrobiennes des macrophages. Les parasites survivent et se multiplient dans les macrophages, et cela se traduit par le développement de la maladie (Laskay *et al.*, 2003, van Zandbergen *et al.*, 2004, Laskay *et al.*, 2008).

C'est suite à un repas sanguin sur des mammifères infectés par *Leishmania* que les phlébotomes femelles sont contaminés par ces parasites. Très rapidement, le sang ingéré par les diptères coagule dans leur intestin médian abdominal. Au bout de vingt-quatre heures, il est circonscrit par une membrane dite péritrophique synthétisée par les cellules épithéliales du tube digestif et composée de chitine et de glycoprotéines. C'est dans ce bol alimentaire que les amastigotes ingérés se différencient en promastigotes. Ceux-ci se divisent activement tout d'abord sous une forme trapue dite procyclique puis ils vont se transformer en formes très fuselées, se divisant également activement et connues sous le nom de nectomonades. Vers le troisième jour, la membrane péritrophique commence à se fragmenter. Les nectomonades qui s'en échappent se fixent alors *via* leur flagelle sur les microvillosités de l'intestin médian abdominal, ce qui leur évite l'élimination lors du transit intestinal. Aux jours 4-5, les nectomonades migrent vers l'intestin médian thoracique. A ce stade, deux stades de différenciation sont visibles. Certaines nectomonades se transforment en promastigotes ovalaires, les haptomonades et paramastigotes qui, pour la plupart, restent attachés *via* leur flagelle à la cuticule chitineuse qui borde les cellules du tube digestif antérieur et de la valve stomodéale qui sépare le tube digestif antérieur du pharynx. D'autres nectomonades se transforment en promastigotes dits métacycliques, qui constituent les sardes infectieux pour les hôtes mammifères (Kamhawi, 2006). Ces parasites, au corps cellulaire très fuselé mais court avec un très long flagelle, qui ne se multiplient plus ou très peu, s'accumulent en grand nombre entre 7 et 10 jours post-infection au niveau de la valve stomodéale (Bates, 2007). La transformation des paramastigotes en métacycliques n'est pas établie. Par ailleurs, une étude récente a introduit cinq stades différents de promastigotes correspondant bien à ce qu'on voit en culture et chez le vecteur, mais pas encore unanimement acceptés (Bates *et al.*, 2004). Il est maintenant clair que l'expression du LPG et des variations structurales de cette molécule sont, au moins en partie, à l'origine des localisations successives occupées par les parasites dans l'intestin des diptères, ainsi que de la métacyclogenèse (synthèse dans (Volf *et al.*, 2008)).

Le cycle est complété lorsqu'un phlébotome, au cours d'un repas sanguin, inocule des promastigotes métacycliques dans le derme de l'hôte mammifère. Il est admis que les haptomonades et paramastigotes fixés au niveau de la valve stomodéale constituent un bouchon à ce niveau qui faciliterait le reflux des promastigotes métacycliques libres lors du mouvement de "pompage" effectué lors du repas sanguin ; alternativement, les haptomonades

pourraient également altérer la valve stomodéale suite à la sécrétion de chitinases, laissant cette valve ouverte, ce qui se traduirait par un afflux de parasites dans les pièces buccales de l'insecte puis par leur éjection lors du repas sanguin (Killick-Kendrick *et al.*, 1974, Rogers *et al.*, 2002, Bates, 2007).

C. *Trypanosoma brucei* et la trypanosomiase africaine.

C.1. La trypanosomiase humaine africaine ou maladie du sommeil

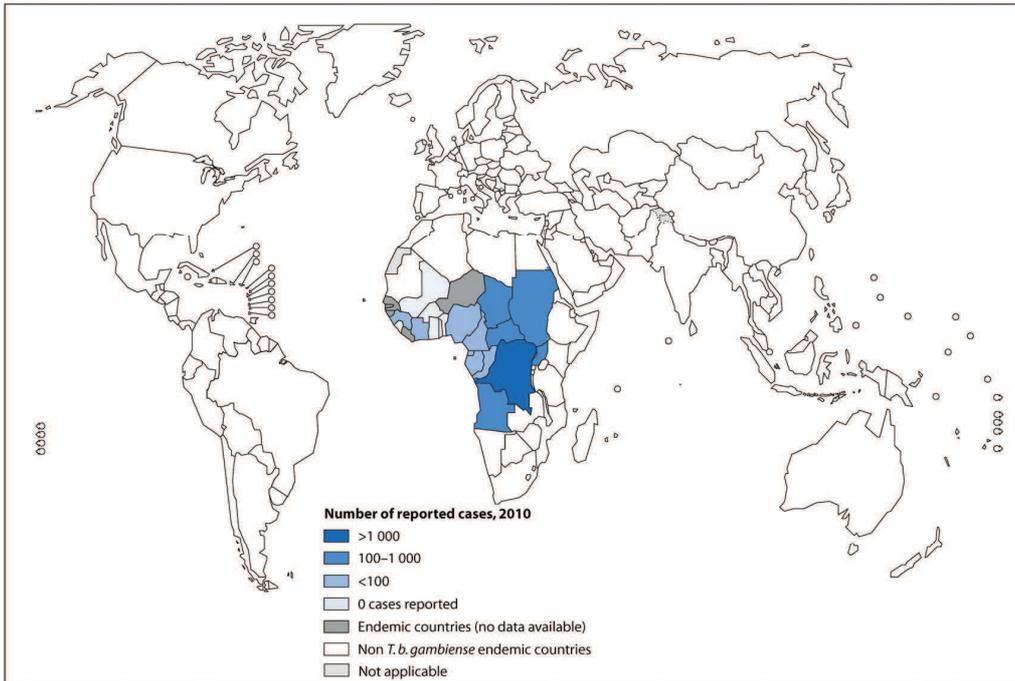
La trypanosomiase humaine africaine, bien que peu prévalente, est assez largement répandue et peut-être mortelle en l'absence de traitement.

C.1.1. Historique

La maladie du sommeil fait des ravages depuis des siècles, pourtant elle ne fut décrite qu'à la fin du XIX^{ème} siècle, et sur des animaux. En effet, les premières traces parlant de la maladie du sommeil viennent du Niger au XIV^{ème} siècle dans les écritures de l'Histoire de l'Afrique du Nord de l'historien et philosophe Ibn Khaldoun (1330-1406). La première description des symptômes de la trypanosomiase africaine en Guinée fut effectuée par Atkins en 1734.

L'association avec l'agent responsable, le trypanosome, fut documentée en 1902 par Forde. Le médecin y décrit le cas d'un homme européen de 42 ans dans une colonie Gambienne (Forde, 1902). Le patient subissait de fortes fièvres et des malaises conduisant Forde à faire un premier diagnostic de malaria. Plus tard, Dutton identifia le parasite dans le sang d'un patient ayant séjourné en Gambie et le nomma *Trypanosoma brucei gambiense*. En 1910, une autre espèce responsable de la maladie du sommeil en Rhodésie (actuel Zimbabwe) fut nommée *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Stephens JWW, 1910). Des expériences décrites en 1912 montrèrent que la "souche" *T. b. rhodesiense* est transmise de l'homme à l'animal par la mouche tsé-tsé (Kinghorn *et al.*, 1912). Le premier traitement a été découvert en 1922 mais il ne ciblait que les premiers stades de la maladie et n'était pas efficace contre toutes les formes. Il faudra attendre 1949 pour avoir des traitements à la fois contre les différents stades de la maladie et contre les différentes formes.

Distribution of human African trypanosomiasis (*T.b. gambiense*), worldwide, 2010



Distribution of human African trypanosomiasis (*T.b. rhodesiense*), worldwide, 2010

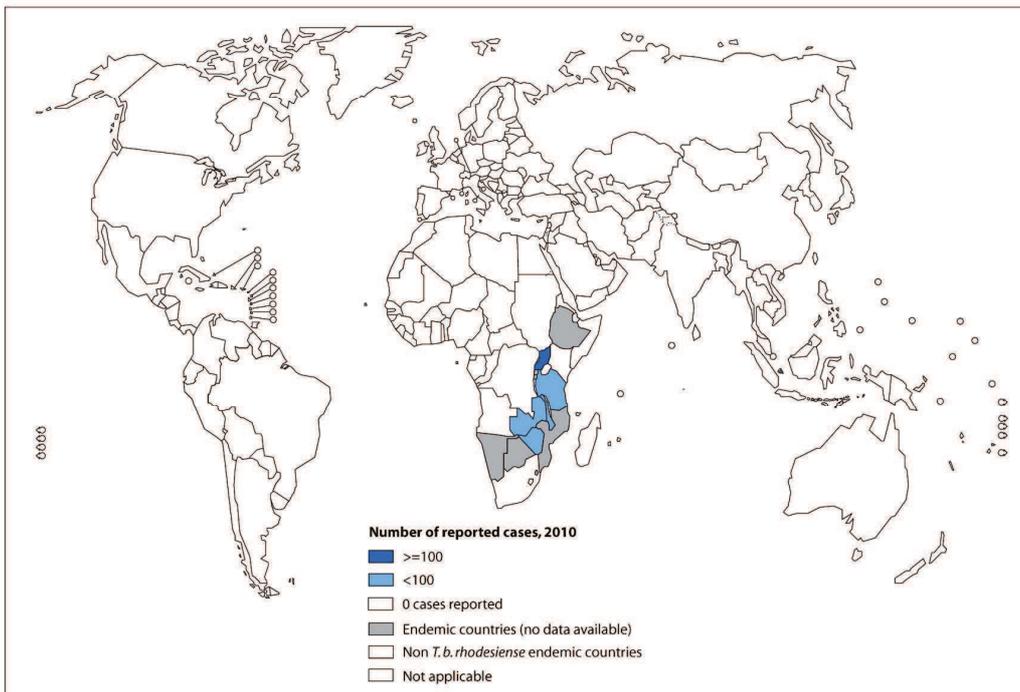


Figure 5 : Répartition géographique de la trypanosomiase humaine Africaine (THA) à *T.b.gambiense* (haut) et à *T.b.rhodesiense* (bas). La THA menace encore aujourd’hui 60 millions de personnes, dans 36 pays d’Afrique subsaharienne.

(http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_trypanosomiasis_gambiense_2010.png);
 (http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_trypanosomiasis_rhodesiense_2010.png)

C.1.2. Formes cliniques de trypanosomiase humaine africaine

La trypanosomiase humaine africaine se présente sous deux formes, dues aux deux "sous-espèces" : *T. brucei gambiense* et *T. brucei rhodesiense*. On attribue à la "sous-espèce" *T. brucei gambiense* la responsabilité de la forme chronique de la maladie du sommeil et à *T. brucei rhodesiense* celle de sa forme aiguë. La troisième sous-espèce, *T. brucei brucei*, est l'agent étiologique de la Nagana chez le bétail.

La trypanosomiase à *T. b. gambiense* représente actuellement plus de 95 % des cas notifiés de trypanosomiase et est retrouvée dans les pays d'Afrique centrale et de l'Ouest. Cette maladie correspond à la forme chronique. Ainsi, une personne peut être infectée pendant des mois voire des années sans présenter de signes ou de symptômes importants de la maladie. Quand les symptômes surviennent, la maladie est souvent déjà à un stade avancé et le système nerveux central est atteint.

La trypanosomiase à *T. b. rhodesiense*, retrouvée en Afrique orientale et australe, provoque une affection aiguë. Les premiers signes et symptômes s'observent au bout de quelques semaines ou de quelques mois après l'infection. La maladie évolue par la suite rapidement et envahit le système nerveux central.

Les trypanosomiasés causées par *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* diffèrent par leur vitesse d'évolution mais les symptômes sont similaires. Ceux-ci peuvent être répartis selon deux stades de la maladie. Le stade 1, ou stade hémolympatique, est caractérisé par des poussées de fièvre, des malaises accompagnés de céphalées, des douleurs articulaires et l'apparition de ganglions cervicaux. A ce stade, plusieurs organes peuvent être infectés : la rate, le foie, la peau, les yeux, le système cardiovasculaire ou encore le système endocrinien. Le stade 2, ou stade neurologique, commence quand le parasite traverse la barrière hémato-encéphalique et envahit le système nerveux central. Apparaissent alors un état confusionnel, des troubles sensoriels, des troubles de la coordination, ainsi qu'une altération des cycles du sommeil à l'origine du nom de la maladie. En l'absence de traitement, la maladie est toujours fatale (Greenwood *et al.*, 1980), soit en quelques semaines, soit en quelques mois ou années.

C.1.3. Localisation géographique et prévalence

La trypanosomiase humaine africaine menace encore aujourd'hui plus de 60 millions de personnes vivant principalement dans des régions rurales d'Afrique orientale, occidentale et centrale, dans 36 pays d'Afrique subsaharienne (<http://www.who.int>); (Barrett *et al.*, 2003) (cf. Fig. 5). En 2009, après des efforts constants pour lutter contre la maladie, le nombre de

Médicament	Sous-espèce ciblée	Stade de la maladie ciblé	Année de première utilisation	Mode d'action sur le parasite	Commentaires
Suramine	<i>T. b. rhodesiense</i>	Stade 1	1922	Perturbation de récepteurs et/ou de signaux de transduction	Quelques effets indésirables au niveau des voies urinaires + allergies
Pentamidine	<i>T. b. gambiense</i>	Stade 1	1937	Biosynthèse des polyamines ; Inhibition sélective d'une ATPase de la membrane plasmique et du transport du Ca ₂ ⁺	Quelques effets indésirables mais généralement bien tolérée
Mélarsoprol	<i>T. b. rhodesiense</i> <i>T. b. gambiense</i>	Stade 2	1949	Métabolisme du trypanothion	Traitement mortel dans 3 à 10% des cas (intoxication arsénicale)
Eflornithine	<i>T. b. gambiense</i>	Stade 2	1981	Biosynthèse des polyamines	Schéma d'administration strict et difficile à appliquer ; onéreux
Nifurtimox	<i>T. b. gambiense</i> <i>T. b. rhodesiense</i> ?	Stade 2 ?	1977	Métabolisme du trypanothion	Effets gastro-intestinaux et neurologiques

Tableau 4 : Traitements disponibles contre les trypanosomiasés humaines Africaines.

cas notifiés est passé en dessous de 10 000 pour la première fois en 50 ans. Le nombre de cas est actuellement estimé à 30 000.

La prévalence de la maladie varie d'un pays à l'autre et d'une région à l'autre au sein d'un même pays. Au cours des 10 dernières années, plus de 70% des cas notifiés ont été observés en République Démocratique du Congo (RDC). En 2008 et 2009, seules la RDC et la République centrafricaine déclaraient plus de 100 nouveaux cas par an. Des pays tels que le Cameroun, le Congo, la Côte-d'Ivoire, le Gabon, la Guinée, la Guinée équatoriale, le Kenya, le Malawi, le Nigéria, la Tanzanie, la Zambie et le Zimbabwe font désormais état de moins de 100 nouveaux cas par an. Le Bénin, le Botswana, le Burkina Faso, le Burundi, l'Éthiopie, la Gambie, le Ghana, la Guinée-Bissau, le Libéria, le Mali, le Mozambique, la Namibie, le Niger, le Rwanda, le Sénégal, la Sierra Leone, le Swaziland et le Togo n'ont notifié aucun nouveau cas depuis plus de 10 ans. La transmission de la maladie semble avoir été interrompue mais il subsiste quelques régions où il est difficile d'évaluer la situation exacte du fait de l'instabilité sociale et/ou des difficultés d'accès qui font obstacle aux activités de surveillance et de diagnostic (<http://www.who.int>).

C.1.4. Traitements

Si le dépistage de la maladie est précoce, les malades ont de grandes chances de guérison. Par contre, des difficultés supplémentaires apparaissent dans le traitement lorsque la maladie a atteint le stade neurologique. En effet, dans ce cas, pour toucher le parasite, les médicaments doivent être capables de franchir la barrière hémato-encéphalique. Ils sont souvent très toxiques (Barrett *et al.*, 2007, Kennedy, 2008), avec d'importants effets secondaires, et les malades qui survivent aux traitements conservent souvent de graves séquelles neurologiques. Le tableau 4 récapitule les différents traitements actuellement disponibles, avec leur spectre d'action (espèce et stade de la maladie), l'année de leur première utilisation, leur mode d'action et leurs principaux effets secondaires.

C.2. Cycle de vie des trypanosomes

C.2.1. Hôtes et vecteur

Comme les *Leishmania*, les trypanosomes africains présentent un cycle parasitaire à deux hôtes: un hôte vertébré et un hôte insecte, ce dernier jouant le rôle de vecteur. C'est la mouche

tsé-tsé ou glossine (cf. Fig. 6) qui transmet la trypanosomiase africaine; il s'agit d'un diptère hématophage de la famille des Glossinidae et du genre *Glossina*, de 6 à 16 mm suivant les espèces.



Figure 6: Photo d'une mouche tsé-tsé ou glossine.

La glossine, diptère hématophage de la famille des Glossinidae et du genre *Glossina*, est le vecteur des THA.

(www.microbiologybytes.com/.../Trypano.html)

L'épidémiologie et la lutte contre la maladie est compliquée par le fait que, outre l'Homme, *T. b. gambiense* peut infecter le porc et le chien et *T. b. rhodesiense* de très nombreux animaux sauvages (buffle, antilope, lion, zèbre,...) et le bétail.

C.2.2. Stades de différenciation

T. brucei est un parasite constamment extracellulaire dont le cycle se déroule dans deux hôtes très différents. Il doit donc être capable de s'adapter de manière rapide et fréquente, en subissant des modifications structurales et métaboliques. Plusieurs formes se succèdent au cours du cycle parasitaire : chez les mammifères, le parasite vit dans du sang à 37°C et doit se protéger des facteurs lytiques et du système immunitaire. Il est également capable de reconnaître et d'utiliser des signaux de son hôte tels que des facteurs de croissance et des cytokines. Après prélèvement par la mouche tsé-tsé, le parasite change radicalement d'environnement : il subit un choc thermique en passant à une température non constante estimée aux alentours de 27°C et doit interagir avec des cellules et un milieu totalement différents dans le tube digestif de l'insecte.

De plus, le cycle de vie de *T. brucei* est caractérisé par une alternance de stades prolifératifs adaptés à l'infection et des stades non prolifératifs couplés à l'acquisition de la compétence à la différenciation, permettant l'adaptation à de nouvelles conditions de croissance (Matthews *et al.*, 2004). On pense que l'alternance de ces phases de multiplication et de quiescence

Etapes dans le vecteur insecte Etapes dans l'hôte Mammifère

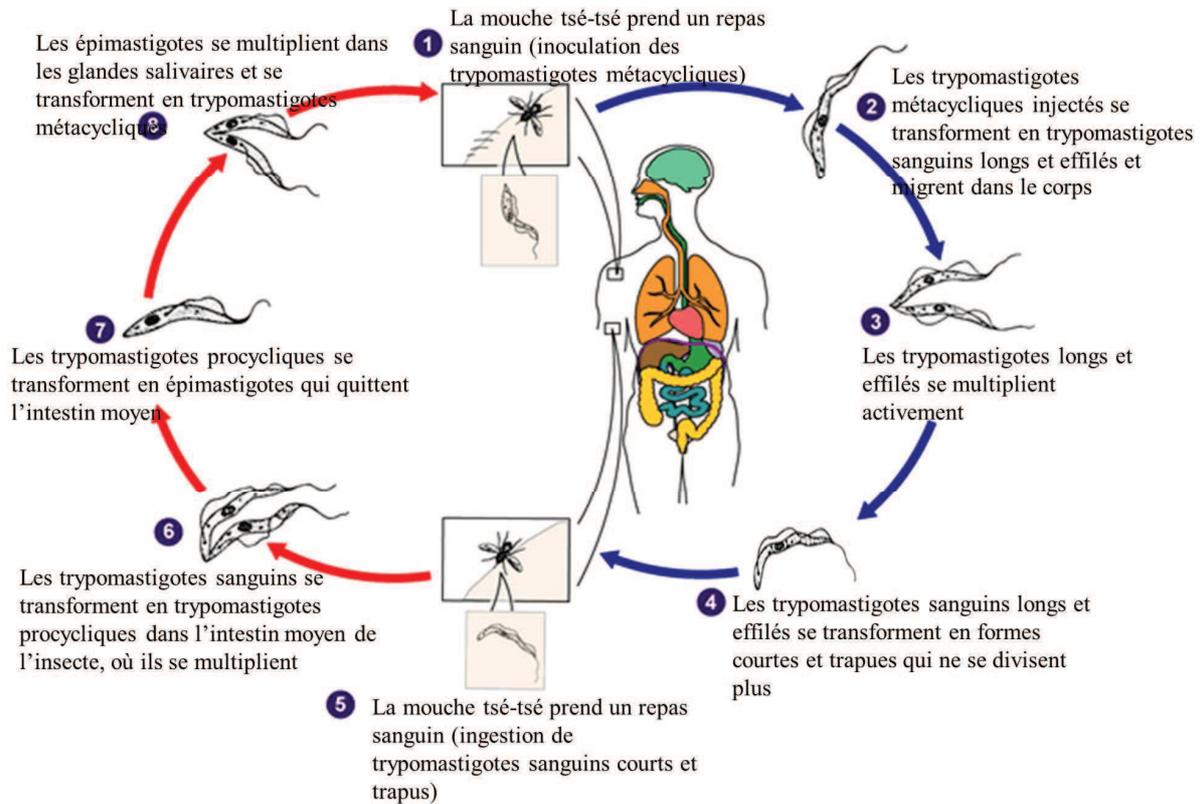


Figure 7 : Cycle de vie de *Trypanosoma brucei*.

Les étapes 2, 3 et 4 se déroulent dans l'hôte Mammifère et les étapes 6, 7 et 8 dans le vecteur insecte. (Adapté de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>)

permet aussi la régulation de la densité de la population avant qu'elle n'atteigne un stade critique pour l'hôte. En effet, une mort précoce de celui-ci n'est pas avantageuse pour le parasite : il doit avoir le temps d'être transmis de la mouche au mammifère, et inversement.

Ainsi, *T. brucei* est essentiellement retrouvé sous quatre stades morphologiques distincts chez ses hôtes successifs : trypomastigote sanguin, trypomastigote procyclique, épimastigote et métacyclique (McKean, 2003).

La forme **trypomastigote sanguine** est retrouvée dans le sang de l'hôte. On distingue les formes sanguines longues et effilées (*long slender*) qui se multiplient activement dans la lymphe et le sang de l'hôte, des formes sanguines courtes et trapues (*short stumpy*) qui ne se divisent plus et sont pré-adaptées à l'insecte vecteur.

La forme **trypomastigote procyclique** est issue de la différenciation des stades sanguins courts et trapus dans l'intestin moyen de la mouche tsé-tsé et se divise activement.

Les **épimastigotes**, longs et très mobiles, migrent de l'intestin moyen de l'insecte vecteur vers les glandes salivaires.

Enfin, les formes **métacycliques**, qui ne se divisent pas, issues des épimastigotes des glandes salivaires, sont adaptées à l'hôte mammifère.

C.2.3. Description du cycle de vie

La mouche tsé-tsé, au cours du repas sanguin sur un hôte mammifère, inocule dans le derme de ce dernier des formes trypomastigotes métacycliques infectantes, présentes dans ses glandes salivaires (cf. Fig.7). Les métacycliques se différencient au point d'inoculation en formes trypomastigotes sanguines longues et effilées (les fonctions mitochondriales de ces formes sont réprimées, le métabolisme du glucose se fait grâce aux glycosomes). Celles-ci se multiplient activement et migrent vers différents sites du corps humain *via* le système lymphatique et le système sanguin. Puis, ces formes longues et effilées se transforment en formes courtes et trapues, qui ne se divisent plus et qui sont pré-adaptées à l'insecte vecteur. Lors d'un repas sanguin sur un hôte infecté par *T. brucei*, les glossines femelles ingèrent des parasites (Vickerman *et al.*, 1988) qui vont alors traverser la membrane péritrophique qui sépare le repas sanguin de la lumière intestinale. Dans l'intestin moyen de l'insecte, ils se différencient d'abord en trypomastigotes procycliques qui se multiplient activement (ils possèdent alors une mitochondrie opérationnelle produisant de l'ATP par le cycle de Krebs), puis en épimastigotes après 2-3 jours. Ces dernières formes, longues et très mobiles (jusqu'à 2 fois plus longues, avec augmentation de la taille du flagelle (Van Den Abbeele *et al.*, 1999)),

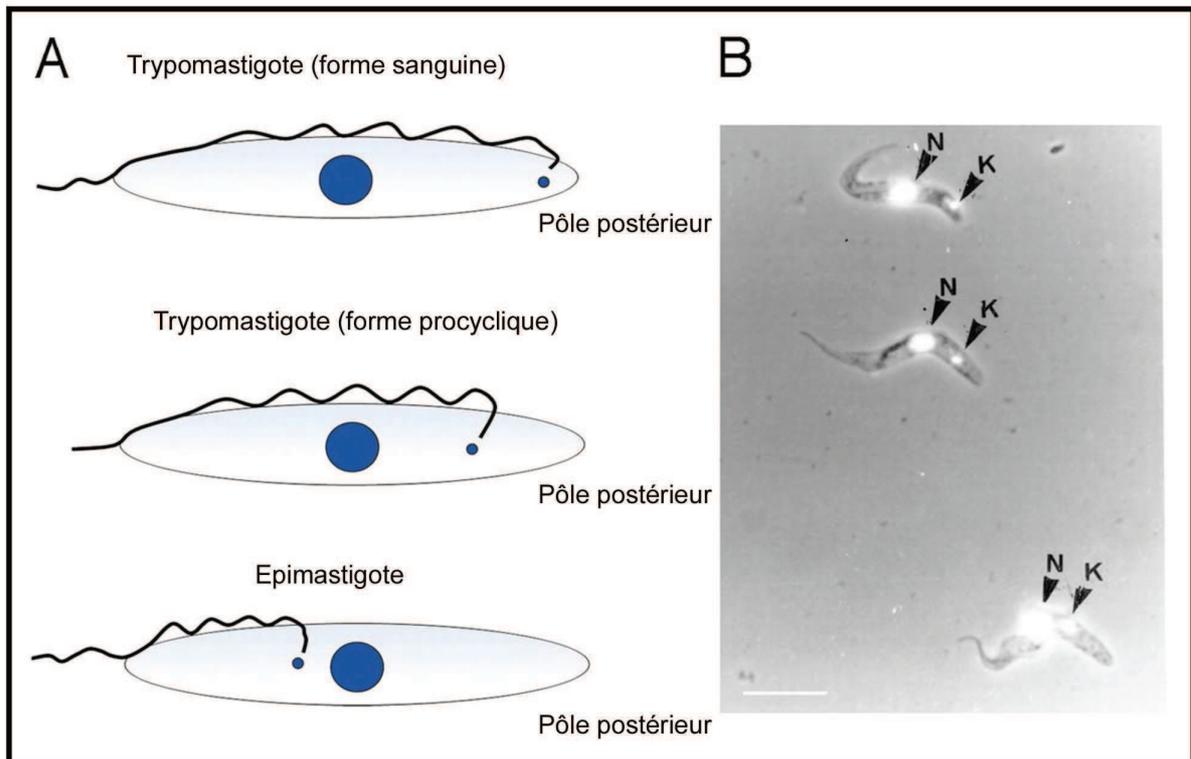


Figure 8: Changement de position du kinétoplaste pendant le cycle de vie de *T. brucei*

A: position relative du kinétoplaste chez les formes trypomastigotes sanguicoles et procycliques ainsi que chez la forme épimastigote en fonction de la position du noyau et de l'extrémité postérieure de la cellule.

B: Images en contraste de phase de la différenciation de sanguicoles stumpy en procycliques. L'ADN nucléaire (N) et du kinétoplaste (K) est marqué au DAPI. Le kinétoplaste est progressivement repositionné (de la cellule du haut vers la cellule du bas). Barre : 20µm.

(Adapté de Matthews K R J Cell Sci 2005;118:283-290).

migrent jusqu'aux glandes salivaires *via* l'œsophage en retraversant la membrane péritrophique. Jusqu'ici, dans le sang et le tube digestif de l'insecte, le parasite se trouve sous forme trypomastigote, c'est-à-dire que le flagelle émerge postérieurement par rapport au noyau. Arrivés dans les glandes salivaires, une nouvelle étape de division s'enclenche, accompagnée d'une différenciation en forme épimastigote : le flagelle émerge antérieurement par rapport au noyau (cf. Fig.8). Ces parasites sont attachés aux microvillosités de la paroi des glandes salivaires par leur flagelle (Tetley *et al.*, 1985). La division se fait alors que les trypanosomes sont attachés à la paroi. Petit à petit, la taille du flagelle régresse, et les épimastigotes, après multiplication, vont donner naissance aux métacycliques infectantes qui ne se divisent plus et qui pourront être inoculés à un nouvel hôte (Vickerman, 1985, McKean, 2003).

Deux points parmi les plus originaux du cycle biologique de *T. brucei* et concernant l'étape chez le mammifère sont à relever :

- 1- L'existence d'une "répression mitochondriale" chez les formes sanguines, liée à un métabolisme énergétique dépendant de la glycolyse seule.
- 2- L'existence, également chez les formes sanguines, ainsi que chez les métacycliques, de la variation antigénique, un mécanisme qui consiste à exposer à sa surface une protéine très immunogène et variante appelée VSG (Variant Surface Glycoprotein). Cette protéine, fortement exprimée, est ancrée à la membrane afin de former une barrière dense, sorte de "manteau protecteur". Environ 10^7 molécules de la même VSG sont ainsi présentes à la surface du trypanosome. Cette grande densité de protéines permet de rendre inaccessible à l'environnement extracellulaire les autres constituants de la membrane plasmique. La VSG présente est remplacée régulièrement. En effet, la capacité de *T. brucei* à pouvoir faire varier ses VSG semble illimitée et chaque parasite peut exprimer plus de 100 gènes de VSG différents (Pays *et al.*, 1998). Au moment où le système immunitaire de l'hôte, ayant reconnu la molécule antigénique, deviendra apte à éliminer la population de parasites qui la porte, seul les cellules qui auront "changé de manteau" seront sélectionnées et pourront, par expansion clonale, être à l'origine de la population suivante.

Ces deux points seront revus plus loin.

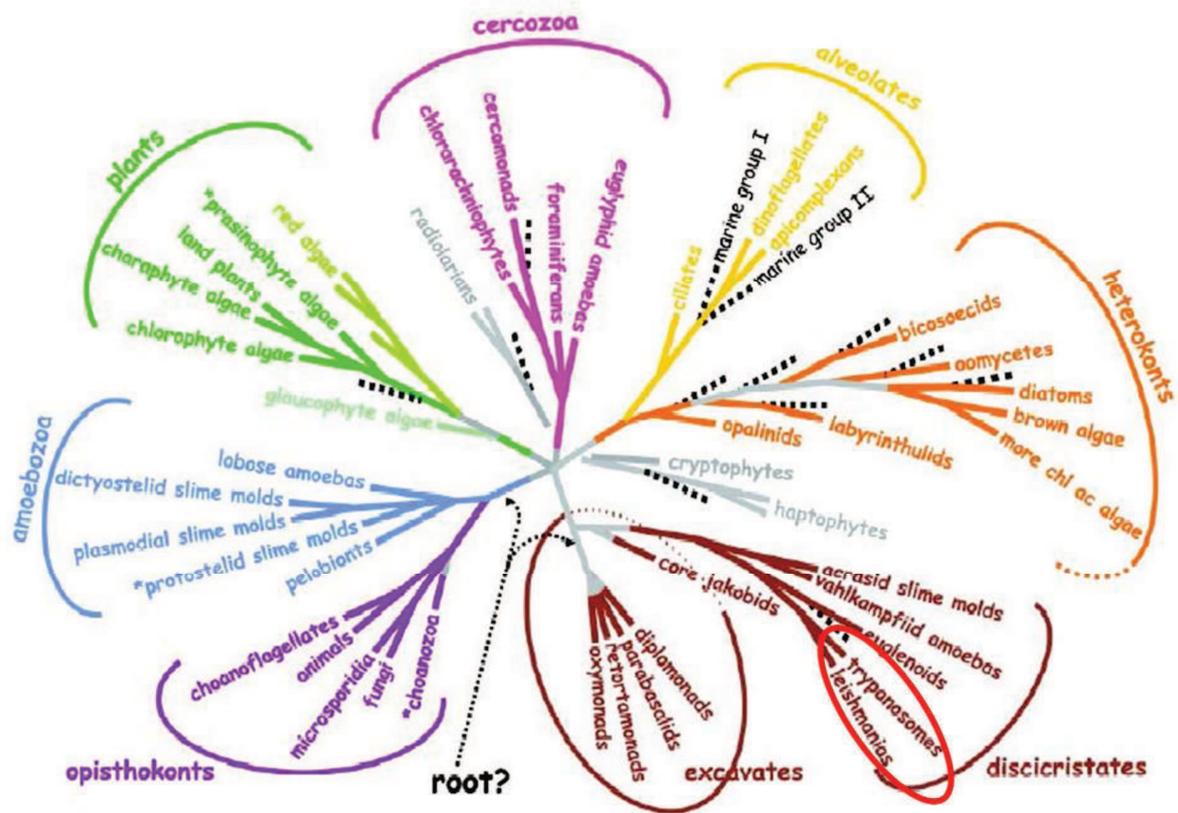


Figure 9 : Arbre phylogénétique de Baldauf.

Les Trypanosomatidés *Leishmania* et *Trypanosoma* appartiennent à une branche (discicristates) très distante phylogénétiquement de celle où sont retrouvés les Eucaryotes classiquement étudiés tels que l'Homme, la souris, la levure, ... (branche des opisthokontes).

D. Particularités de la biologie moléculaire et cellulaire des Trypanosomatidés

Outre leur importance médicale, les Trypanosomatidés présentent un grand intérêt au niveau fondamental : ces protozoaires parasites apparaissent très distants phylogénétiquement des êtres vivants classiquement étudiés tels que l'homme et la levure (Dacks *et al.*, 2001, Baldauf, 2003), comme le montre la figure 9. Cette grande distance phylogénétique est soulignée par de nombreux aspects originaux de leur biologie moléculaire et cellulaire.

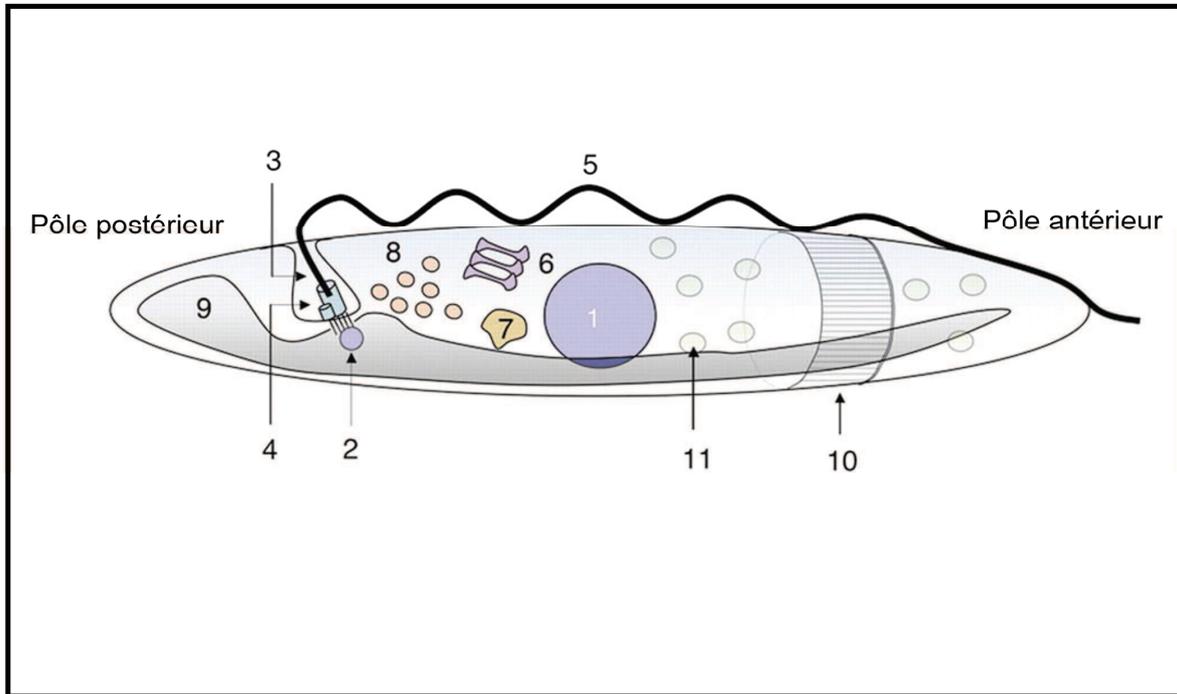
D.1. Particularités en biologie cellulaire

Les cellules de Trypanosomatidés possèdent les constituants classiques d'une cellule eucaryote, tels que noyau, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondrie, système d'endo- et exocytose, lysosomes... Cependant, plusieurs constituants présentent des traits spécifiques aux Trypanosomatidés.

Par exemple, le corps cellulaire est recouvert d'un "corset" spiralé de microtubules sous-pelliculaires stables, attachés à une membrane plasmique dite pelliculaire (Clayton *et al.*, 1995, Gull, 1999, Bastin *et al.*, 2000b, Landfear, 2001, Landfear *et al.*, 2001). On peut noter que le cytosquelette cellulaire est uniquement composé de microtubules, les filaments d'actine étant absents chez les Trypanosomatidés.

Par ailleurs, la mitochondrie consiste en un unique organite, large et étiré en réseau sur toute la longueur du corps cellulaire, avec un ADN mitochondrial également unique, appelé kinétoplaste, fait d'un réseau très condensé de molécules circulaires (cf. *infra*). Le kinétoplaste est relié, à travers la paroi de la mitochondrie, à un élément du cytosquelette, le corps basal du flagelle, par des structures filamenteuses de nature inconnue (Robinson *et al.*, 1991, Robinson *et al.*, 1994).

L'unique flagelle émerge de la partie antérieure de la cellule, libre par rapport au corps cellulaire. Des différences notables existent entre *Leishmania* et *Trypanosoma* quant au flagelle. En effet, chez *T. brucei*, quel que soit le stade du cycle de vie, le flagelle est attaché tout au long du corps cellulaire par des jonctions filamenteuses à nouveau particulières appelées FAZ (Flagellar Attachment Zone), intimement associées au corset de microtubules; il émerge, libre, uniquement à son extrémité antérieure. Cet ensemble flagelle/membrane, le



- | | |
|--|-----------------------------------|
| 1. Noyau | 7. Lysosome |
| 2. Kinétoplaste | 8. Endosomes |
| 3. Poche flagellaire | 9. Mitochondrie |
| 4. Corps basal et corps probasal | 10. Cytosquelette de microtubules |
| 5. Axonème et flagelle (paraflagellaire) | 11. Glycosomes |
| 6. Golgi | |

Figure 11: Architecture cellulaire du trypanosome (représentation simplifiée)

(Adapté de Matthews K R J Cell Sci 2005;118:283-290).

long du corps cellulaire, est qualifié de "membrane ondulante" (cf. Fig.10) et vaut aux trypanosomes un mouvement bien différent de celui des leishmanies où le flagelle est entièrement libre.

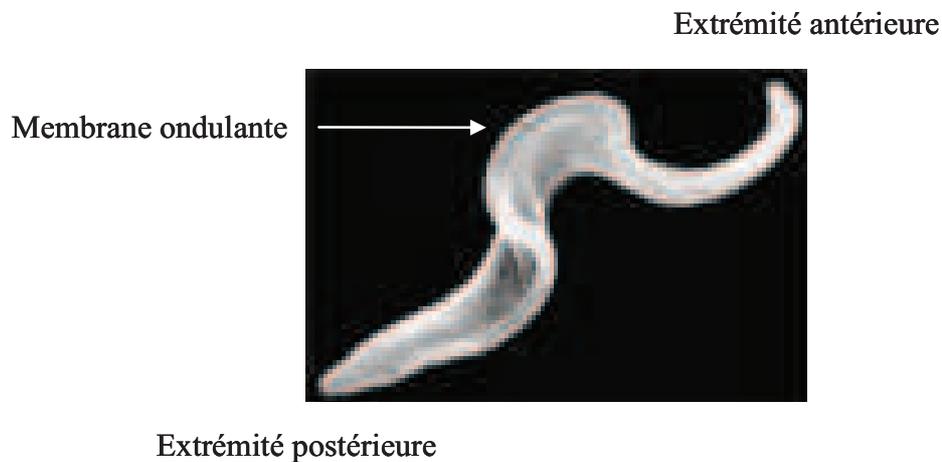


Figure 10: Image en Microscopie à Balayage d'un trypanosome.
La zone où le flagelle est attaché le long de la membrane est qualifiée de membrane ondulante. (<http://www.pasteur.fr>)

Autour de la base du flagelle et donc du corps basal se trouve une invagination appelée poche flagellaire, qui, en raison de l'existence du "corset" de microtubules sous-membranaires, constitue le seul site d'endo- et exocytose pour la cellule.

La figure 11 donne une représentation simplifiée de la localisation des principaux constituants structuraux de la cellule de trypanosome. Comme on peut le voir cette cellule contient un certain nombre d'organites spécialisés qui sont le lieu de réactions biochimiques importantes, à l'exemple des glycosomes, qui semblent avoir divergé à partir des peroxysomes (Oppendoes, 1984, Wiemer *et al.*, 1996), et sont des organites contenant les enzymes de la glycolyse. A noter que, dans les formes sanguines de *T. brucei*, la mitochondrie est une structure tubulaire simple dépourvue de crêtes, ce qui reflète l'absence de respiration mitochondriale à ce stade du cycle parasitaire, la production d'énergie étant alors dépendante des réactions glycolytiques qui s'effectuent à l'intérieur des glycosomes. Glycosomes, cytosol et mitochondrie coopèrent donc dans le métabolisme énergétique des Trypanosomatidés (Parsons, 2004).

Enfin, le **cycle cellulaire** des Trypanosomatidés présente de nombreuses spécificités et sera **revu au chapitre E de ces Généralités.**

D.2. Particularités biochimiques

Composition de la membrane plasmique.

Chez *Leishmania*, la face externe de la membrane plasmique présente une enveloppe composée essentiellement de glycolipides et glycoprotéines à ancre GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) tels que le LPG (lipophosphoglycane), les GIPL (glycosylinositolphospholipides) et la gp63 (glycoprotéine 63 ou leishmanolysine) (pour revue (Olivier *et al.*, 2012)). Le LPG sert, chez l'insecte, de ligand dans l'attachement du parasite au niveau de l'intestin (Sacks *et al.*, 2000). Chez l'hôte mammifère, il protège les promastigotes métacycliques de l'action lytique du complément et joue un rôle dans l'adhésion et l'incorporation du parasite au niveau du macrophage (Jokiranta *et al.*, 1995).

Il a ensuite été montré que le LPG était capable d'inhiber efficacement la maturation du phagosome dans les stades précoces de l'infection (Desjardins *et al.*, 1997). Cette stratégie permettant aux promastigotes de survivre à l'intérieur de la vacuole jusqu'à leur différenciation en amastigotes, formes capables de persister et de se diviser dans les compartiments acides.

La surface des promastigotes et des amastigotes de *Leishmania* est également revêtue d'une classe abondante de glycolipides, petits et structurellement apparentés aux phospholipides glycosylinositol, les GIPL. Certains GIPL se sont révélés être liés au GPL et aux ancres GPI, tandis que d'autres sont des entités de surface distinctes (Descoteaux *et al.*, 1999). Ces molécules peuvent être importantes pour la survie et la progression intracellulaires des amastigotes, comme l'expression des GPL est fortement réduite dans cette forme parasitaire, laissant uniquement les GIPL comme composants de surface majeurs.

La gp63 quant à elle joue un rôle dans la résistance du parasite à l'activité lytique du complément et peut être considérée comme un facteur de virulence chez l'hôte mammifère (Joshi *et al.*, 2002). Des données plus récentes (pour revue (Isnard *et al.*, 2012, Olivier *et al.*, 2012)) précisent l'impact de la gp63 de *Leishmania* sur la signalisation des macrophages et la réponse immunitaire innée. Pour résumer ces effets, avant l'entrée des parasites dans les macrophages de l'hôte, gp63 fournit au parasite la résistance à la lyse médiée par le complément et facilite l'absorption des promastigotes par les macrophages. Dans le macrophage hôte, gp63 est responsable de l'activation de protéines tyrosine phosphatases (PTP; SHP-1, PTP1B et TCPTP) qui conduisent à l'altération des voies JAK, MAP et IRAK-1. La gp63 est également capable de down réguler la synthèse des protéines des macrophages

de l'hôte en modifiant la signalisation dépendante de mTORC1. Et enfin, dans le noyau, l'inactivation des facteurs de transcription tels qu'AP-1 et NF- κ B impliquent un clivage spécifique et la dégradation des sous-unités par gp63. Au total, cette inactivation de la signalisation médiée par gp63 inhibe les fonctions antimicrobiennes des macrophages, ce qui favorise la survie et la propagation du parasite.

Chez *T. brucei*, dans les cellules métacycliques et sanguines, la membrane (que ce soit au niveau du flagelle, de la poche flagellaire ou du corps cellulaire) est recouverte d'un manteau dense de glycoprotéines variantes dites VSG (*Variant Surface Glycoproteins*) qui, comme on l'a vu plus haut, permet au trypanosome d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Cross, 1975). Ce manteau est constitué de procycline dans les formes procycliques (Cross, 1996).

Métabolismes particuliers.

Métabolisme des purines.

Contrairement à l'hôte mammifère, les Trypanosomatidés sont incapables de synthétiser l'adénosine et la guanosine, précurseurs de la synthèse des bases puriques. Ils doivent donc puiser ces composés dans leur environnement. Ceci s'effectue principalement par l'intermédiaire de deux transporteurs : *LdNT1* et *LdNT2*, identifiés chez *L. donovani* (Aronow *et al.*, 1987, Landfear, 2001), mais d'autres systèmes de transport ont été caractérisés (Phelouzat *et al.*, 1995, Goldberg *et al.*, 1997).

Métabolisme des polyamines.

Les polyamines sont de petites molécules retrouvées dans toutes les cellules, jouant un rôle important dans la biosynthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines (Tabor *et al.*, 1984, Igarashi *et al.*, 2000). Chez les Trypanosomatidés, le métabolisme des polyamines est essentiel. En effet, outre leur rôle classique, elles interviennent dans la formation du trypanothion (deux molécules de glutathion réunies par une molécule de spermidine). Celui-ci constitue, avec les trypanothion réductases, le complexe de détoxification des Trypanosomatidés qui remplace le complexe glutathion/glutathion réductase retrouvé chez les autres Eucaryotes.

Métabolisme des stérols.

Contrairement à l'hôte mammifère, chez *Leishmania* et chez les formes procycliques de *T. brucei*, le stérol majeur synthétisé à partir de la déméthylation du lanostérol et présent dans les membranes n'est pas le cholestérol mais l'ergostérol, comme chez les champignons.

Métabolisme du glucose.

Chez les Trypanosomatidés, comme chez tous les *Kinetoplastida*, et contrairement aux mammifères, les 7 à 9 premières enzymes du métabolisme du glucose sont compartimentées dans un organite apparenté aux peroxyosomes : le glycosome (Opperdoes *et al.*, 1977).

Par ailleurs, *T. brucei* présente une grande originalité du métabolisme énergétique, qui est fondamentalement différent selon le stade du cycle parasitaire. Ainsi, si les formes sanguines utilisent le glucose du sang de l'hôte comme source d'énergie, les formes procycliques préfèrent les acides aminés et plus particulièrement la proline, plus abondante chez l'insecte (Clayton *et al.*, 1996). En outre, dans les formes sanguines, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire ne sont pas fonctionnels, la production d'ATP étant alors totalement dépendante de la glycolyse réalisée dans les glycosomes (Bakker *et al.*, 1999), contrairement aux formes insectes.

D.3. Particularités en biologie moléculaire

D.3.1. Organisation du génome nucléaire.

En 1994, un réseau scientifique international était initié à la suite d'une réunion d'experts convoquée par l'Organisation Mondiale de la Santé, avec pour but la cartographie et le séquençage du génome des Trypanosomatidés.

Concernant *Leishmania*, ce réseau s'intitulait LGN pour *Leishmania* Genome Network.

La première étape de ce vaste projet a consisté en une étude de « pré-génomique » visant à établir l'organisation générale du génome. Dans le cadre du LGN, des caryotypes moléculaires ont été établis par électrophorèse en champ pulsé chez différentes espèces et souches de *Leishmania*, permettant de déterminer précisément la taille du génome haploïde. Celle-ci est de 36Mb, avec des variations de $\pm 0,5$ Mb (Wincker *et al.*, 1996) selon les souches. Le nombre de gènes est estimé à environ 8000, répartis sur 36 chromosomes dont la taille varie de 0,3 à 2,8Mb. Le génome possède une grande richesse en G/C : 60% en moyenne (Alvarez *et al.*, 1994). Il s'agit d'un génome de relativement faible complexité, avec 60-65% de séquences uniques, 13% de séquences moyennement répétées et 12% de séquences fortement répétées (Leon *et al.*, 1978). La caractéristique essentielle des caryotypes moléculaires est le haut degré de polymorphisme observé entre souches différentes, même

taxonomiquement et géographiquement proches, du à un polymorphisme de taille des chromosomes homologues (synthèse dans (Bastien *et al.*, 1992b)). Ce dernier reflète une plasticité génomique importante qui se manifeste, notamment, par l'instabilité des régions subtélomériques des chromosomes et par de nombreuses amplifications d'ADN, aussi bien intra- qu'extra-chromosomiques.

Le projet de génomique proprement dit s'est appuyé sur la base de ces caryotypes pour établir la séquence complète du génome, chromosome par chromosome, d'abord pour *L. major* (Ivens *et al.*, 2005) puis pour *L. infantum* et *L. braziliensis* (Peacock *et al.*, 2007) et enfin plus récemment *L. mexicana*. Ces données de séquençage sont disponibles en ligne : (http://www.sanger.ac.uk/Projects/L_major/who&where.shtml), (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/protozoa/leishmania-infantum.html>), (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/protozoa/leishmania-braziliensis.html>) et (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/protozoa/leishmania-mexicana.html>) pour *L. major*, *L. infantum*, *L. mexicana* et *L. braziliensis*, respectivement.

Enfin, l'une des caractéristiques les plus marquantes de ce génome est l'aneuploïdie constitutive récemment mise en évidence pour ce parasite (Sterkers *et al.*, 2011, Sterkers *et al.*, 2012), qui entérine un long débat à propos du caractère "essentiellement diploïde" de ce parasite (Bastien *et al.*, 1992a). Plus précisément, et de façon encore plus surprenante, cette aneuploïdie, présente un caractère "mosaïque", c'est à dire que chaque cellule d'une souche donnée présente une ploïdie variable (entre mono-, di- et trisomie) pour chacun de ses chromosomes. L'"aneuploïdie mosaïque" ainsi engendrée variant également entre souches, ce phénomène a pour conséquence une extraordinaire diversité génomique, et par conséquent génétique, qui pourrait intervenir dans l'adaptabilité du parasite.

Le génome de *T. brucei* est organisé de façon très différente de celui de *Leishmania*. Si la taille du génome haploïde est proche (35 Mb, avec près de 25% de variation entre isolats (Kanmogne *et al.*, 1997)), il est organisé en trois classes de chromosomes identifiées selon leur taille : les macrochromosomes, les chromosomes intermédiaires et les minichromosomes (El-Sayed *et al.*, 2000).

Les macrochromosomes, au nombre de 11, tous diploïdes (Melville *et al.*, 1998), ont une taille de 1 à 6 Mb. Leur séquençage a été achevé en 2004, dans le cadre du projet de séquençage de *T. b. brucei* mené conjointement par l'Institut Sanger (Royaume-Uni) et

l'Institut pour la Recherche Génomique (TIGR, Etats-Unis) (Berriman *et al.*, 2005). Ces données de séquençage sont disponibles en ligne : (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/protozoa/trypanosoma-brucei.html>). Les macrochromosomes contiennent 9068 gènes prédits, dont environ 900 pseudogènes et environ 1700 gènes spécifiques de *T. brucei* (Berriman *et al.*, 2005).

Les chromosomes intermédiaires, dont le nombre et la ploïdie sont inconnus, ont une taille de 200 à 900kb (El-Sayed *et al.*, 2000). Sur ces chromosomes sont présents des gènes de ménage et des séquences de VSG situées ou non près des télomères (Lips *et al.*, 1993, Rudenko *et al.*, 1998).

Enfin, les minichromosomes sont au nombre d'une centaine linéaires, ils mesurent de 50 à 150kb et sont considérés comme aneuploïdes. Ces minichromosomes sont également considérés comme des réservoirs pour les gènes de VSG puisqu'ils semblent contenir pour la plupart des gènes de VSG non exprimés (El-Sayed *et al.*, 2000, Alsford *et al.*, 2001).

D.3.2. Organisation du génome mitochondrial.

Le génome mitochondrial ou kinétoplaste est organisé de façon similaire chez *Leishmania* et *T. brucei*. Il est constitué de deux catégories de molécules d'ADN circulaire qui sont entrelacées et organisées en réseau : les maxi-cercles et les mini-cercles. Les maxi-cercles (20 à 40kb selon les espèces), au nombre de 20 à 50 par génome mitochondrial, tous identiques au sein d'une même cellule, sont l'équivalent du génome mitochondrial des mammifères. Ils codent pour les ARN ribosomiques et certaines des sous-unités des complexes respiratoires (cytochrome oxydase, apocytochrome b), ils produisent les transcrits qui sont "révisés" par insertion ou délétion de résidus uridine pour former un cadre ouvert de lecture (Shlomain, 2004, Liu *et al.*, 2005a, Lukes *et al.*, 2005). Les mini-cercles, au nombre de 5 000 à 12 000 par cellule, ont une taille inférieure à 1 kb et sont plus ou moins polymorphes en séquence au sein d'une même souche (Simpson, 1987). Ils codent la plupart des ARN guides qui assurent la spécificité de "révision" de l'ARN (« *RNA editing* » en anglais) des maxicercles, processus de modification de la séquence nucléotidique (cf. ci-dessous).

D.3.3. Organisation et expression des gènes.

Organisation et expression des gènes nucléaires.

Les gènes des Trypanosomatidés, qui ne comportent pas d'introns, sont organisés de façon unique dans le monde animal. Ils sont en effet regroupés en plus ou moins longues unités "de

type polycistronique", où ils sont orientés dans le même sens et disposés sur le même brin d'ADN. La transcription de ces "clusters" est polycistronique, c'est-à-dire sans interruption entre les différents gènes d'une unité de transcription. Certaines unités peuvent être de très grande taille ; par exemple, une seule de 600kb et regroupant 138 gènes, est présente sur le chromosome 11. Cependant, contrairement aux unités polycistroniques bactériennes, les gènes qui les constituent ne présentent aucun rapport fonctionnel entre eux (Myler *et al.*, 1999). Par ailleurs, les gènes y sont fréquemment arrangés en tandem, ce qui pourrait être un moyen simple d'augmenter le niveau de transcription.

Autre particularité, à ce jour, aucun promoteur lié à la polymérase II, à l'exception de celui du gène du mini-exon (Gilinger *et al.*, 2001, Clayton, 2002), n'a été caractérisé chez les Trypanosomatidés.

Enfin, la maturation de l'ARN messager se fait par transépissage, c'est-à-dire ajout d'une courte séquence de 39 bases appelée « mini-exon » en 5' de chaque ARN pré-messager (qui joue également le rôle de "capping" (LeBowitz *et al.*, 1993), et par une classique polyadénylation en 3' qui s'initie à proximité d'un résidu adénine (Matthews *et al.*, 1994c) (donc sans séquence consensus comme chez les Eucaryotes supérieurs).

Au total, la régulation de l'expression génique chez les Trypanosomatidés semble ne pouvoir se faire qu'à un niveau post-transcriptionnel et traductionnel et surtout post-traductionnel. Cette quasi-absence de régulation transcriptionnelle classique a fait se poser la surprenante question « *Existe-t-il une vie sans contrôle transcriptionnel ?* » chez *Leishmania* (Clayton, 2002).

Expression des gènes mitochondriaux.

Les ARN transcrits à partir des gènes des maxi-cercles subissent des modifications importantes appelées *RNA editing* ou "montage" de l'ARN. Ce processus consiste en l'addition ou la délétion de résidus uridine au sein d'ARN pré-messagers non fonctionnels, générant ainsi des ARNm fonctionnels. Bien que ce processus existe dans divers organismes, il est particulièrement actif dans le génome mitochondrial des Trypanosomatidés. Ce mécanisme de montage des ARN pourrait avoir pour rôle, entre autres, une régulation différentielle des gènes mitochondriaux en fonction du développement parasitaire (Blum *et al.*, 1990).

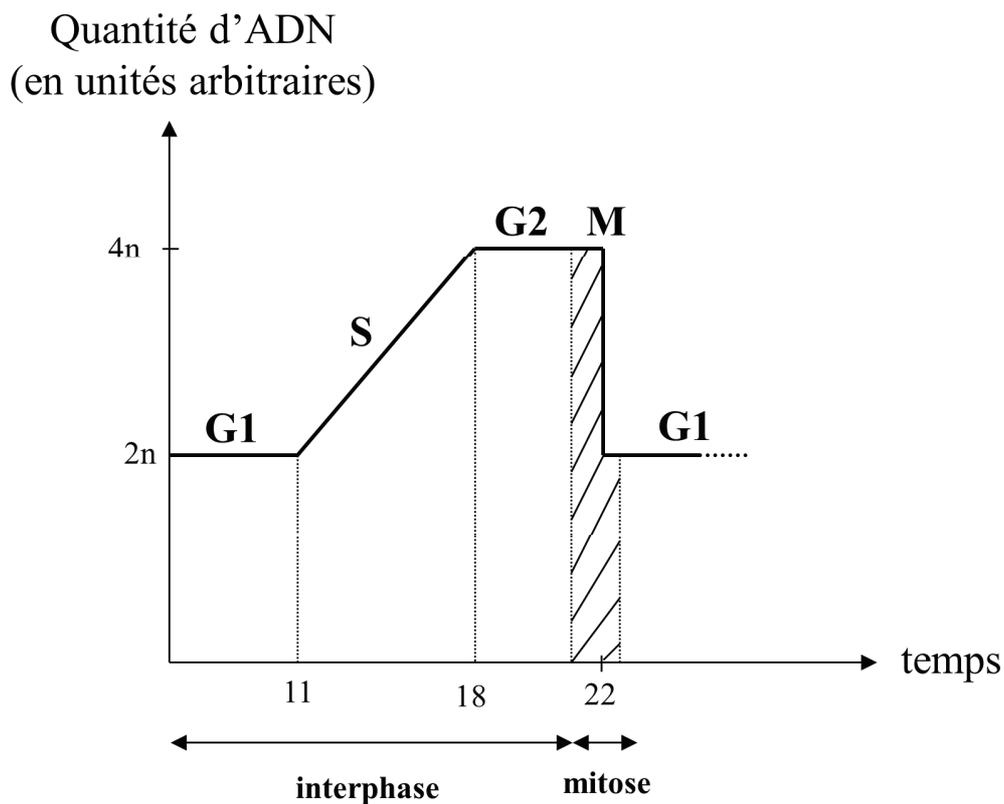


Figure 12 : Evolution de la quantité d'ADN au cours du cycle cellulaire.

La cellule qui possède $2n$ quantités d'ADN au cours de la phase de croissance G1 voit celle-ci doubler progressivement au cours de la phase S de synthèse ou réplication. Puis, après une deuxième phase de croissance, notée G2, la cellule entre en mitose M au cours de laquelle la quantité d'ADN chute brutalement à $2n$, ce qui correspond à l'individualisation de deux cellules filles à partir de la cellule mère. La cellule poursuit ensuite son cycle en entrant en G1,...

Les phases G1, S et G2 constituent ce qu'on appelle l'interphase. Le cycle entier dure environ 20 heures dans une cellule humaine classique, avec 1 heure de mitose approximativement.

Variation antigénique.

Comme nous l'avons vu plus haut, la variation antigénique dans les formes sanguines de *T. brucei* correspond à un mécanisme moléculaire sophistiqué qui permet au parasite d'échapper à la réponse immunitaire humorale de l'hôte.

Le remplacement d'une VSG par une autre est indépendant des stimuli environnementaux et a lieu spontanément à une fréquence qui peut varier d'une souche à l'autre. Pour une souche adaptée en laboratoire, elle se situe entre 10^{-7} et 10^{-6} remplacements par cellule et par génération, et pour une souche sauvage autour de 10^{-2} , c'est-à-dire environ toutes les 8,5 heures (Turner *et al.*, 1989, Cross, 1990, Davies *et al.*, 1997, Cross *et al.*, 1998).

Il existe environ 1000 gènes de VSG (Van der Ploeg *et al.*, 1982) mais un seul est exprimé à la fois dans une cellule donnée et dans la population de parasites ; cette expression dépend de l'activation du site d'expression où est situé le gène de VSG. Sur les grands chromosomes, les sites d'expression des VSG sont localisés à proximité des télomères (Pays *et al.*, 1998, Borst *et al.*, 2001), alors que la majorité des gènes de VSG sont localisés dans les régions subtélomériques des mega- et minichromosomes, ces derniers étant considérés comme un réservoir de gènes de VSG (Alsford *et al.*, 2001). Les copies de gènes de VSG sont alors activées ou désactivées par différents processus : conversion génique, activation in situ ou recombinaison réciproque (Pays *et al.*, 1998, Robinson *et al.*, 1999, Borst *et al.*, 2001). A l'inverse, la mise sous silence (*silencing*) des sites d'expression inactifs (gènes non exprimés) est régulée par des mécanismes d'ordre épigénétique.

E. Le cycle cellulaire chez les *Trypanosomatidés*.

E.1. Description du cycle cellulaire

Le suivi de la quantité d'ADN contenue dans le noyau d'une cellule au cours du cycle cellulaire permet de distinguer différentes phases dans ce cycle. Ainsi, la description classique du cycle cellulaire des Eucaryotes comporte quatre périodes principales relatives à l'activité nucléaire (cf. Fig.12) : une phase "de repos" dite G1, une phase de synthèse d'ADN dite S et une phase G2, suivie de la mitose (phase M). Au cours de la phase S, la quantité d'ADN passe progressivement de $2n$ à $4n$: c'est la phase de réplication de l'ADN. La phase S est précédée par la phase G1 (pour *Gap* ou *Growth*) au cours de laquelle la cellule se prépare à entrer en

mitose M. Lors de cette dernière, qui se termine par la séparation de la cellule en deux cellules filles identiques, la quantité d'ADN passe brutalement de $4n$ à $2n$, puis la cellule entre à nouveau en phase G1, etc...

Une des particularités uniques du cycle cellulaire des *Trypanosomatidae* est qu'il associe en fait deux cycles à la fois indépendants et parfaitement synchronisés : un cycle classique aboutissant à la division nucléaire et un cycle régissant la division du kinétoplaste. Le cycle cellulaire, au sens large, correspond donc en réalité, à ces deux cycles imbriqués. La spécificité unique de ce cycle est que la division cellulaire (cytodiérèse) est gouvernée par le bon déroulement du cycle associé au kinétoplaste. L'indépendance de ces deux cycles l'un par rapport à l'autre est objectivée par le fait qu'on peut bloquer la division nucléaire sans bloquer celle du kinétoplaste et vice-versa (Woodward *et al.*, 1990, Robinson *et al.*, 1995), ce qui produit des cellules possédant plusieurs noyaux ou plusieurs kinétoplastes, respectivement.

E.2. Modifications morphologiques observées au cours du cycle cellulaire

Chez *T. brucei* :

Au cours du cycle cellulaire, chez *T. brucei*, le **corps basal** commence par se dupliquer, en même temps que les pro-corps basaux deviennent matures (Sherwin *et al.*, 1989). Ce premier événement permet la réplication et la ségrégation du génome mitochondrial (Robinson *et al.*, 1991). Le nouveau corps basal et le kinétoplaste associé migrent alors vers l'extrémité postérieure de la cellule, dont la longueur augmente. Une nouvelle zone d'attachement au flagelle (**FAZ**) est assemblée, probablement à partir de la zone du corps basal, avant la formation du **nouveau flagelle** et sa sortie de la poche flagellaire. Le corps basal postérieur mature se trouve adjacent au nouveau flagelle qui s'allonge vers l'extrémité antérieure de la cellule, d'abord relativement rapidement puis plus lentement à partir du moment où les deux corps basaux sont séparés par plus de $2\mu\text{m}$, en même temps que la FAZ. Une zone de connexion entre le nouveau et l'ancien flagelle, appelée **FC** (*Flagella Connector*), présente uniquement lors de la duplication cellulaire, a été identifiée, permettant la mise en place correcte du nouveau flagelle par rapport à l'ancien : plus précisément, le FC connecte l'extrémité distale de l'axonème du nouveau flagelle au côté de l'axonème de l'ancien flagelle (Briggs *et al.*, 2004). Puis, la **mitose** se déroule et le noyau le plus postérieur migre entre les deux kinétoplastes. Durant la mitose, la membrane nucléaire et le nucléole ne sont pas

désassemblés, comme c'est le cas chez beaucoup d'autres protozoaires (Ogbadoyi *et al.*, 2000). La **cytodiérèse** s'initie à l'extrémité antérieure (pour revue (Hammarton *et al.*, 2007)), par l'intermédiaire de l'ingression d'un sillon de clivage qui suit l'axe hélicoïdal de la cellule (Cf. Fig.13, adaptée de (McKean *et al.*, 2003)) et se poursuit vers l'extrémité postérieure pour générer deux cellules filles, chacune héritant d'un noyau, d'un corps basal et kinétoplaste et d'un flagelle/FAZ. Il semble que ce soit la FAZ, dont la position est définie par le nouveau flagelle (Kohl *et al.*, 1999), qui fournirait l'information structurelle nécessaire au positionnement du sillon de clivage. Par conséquent, le choix du site de clivage serait influencé par la présence d'un corps basal postérieur et d'un nouveau flagelle et non par celle du noyau fils (Robinson *et al.*, 1995).

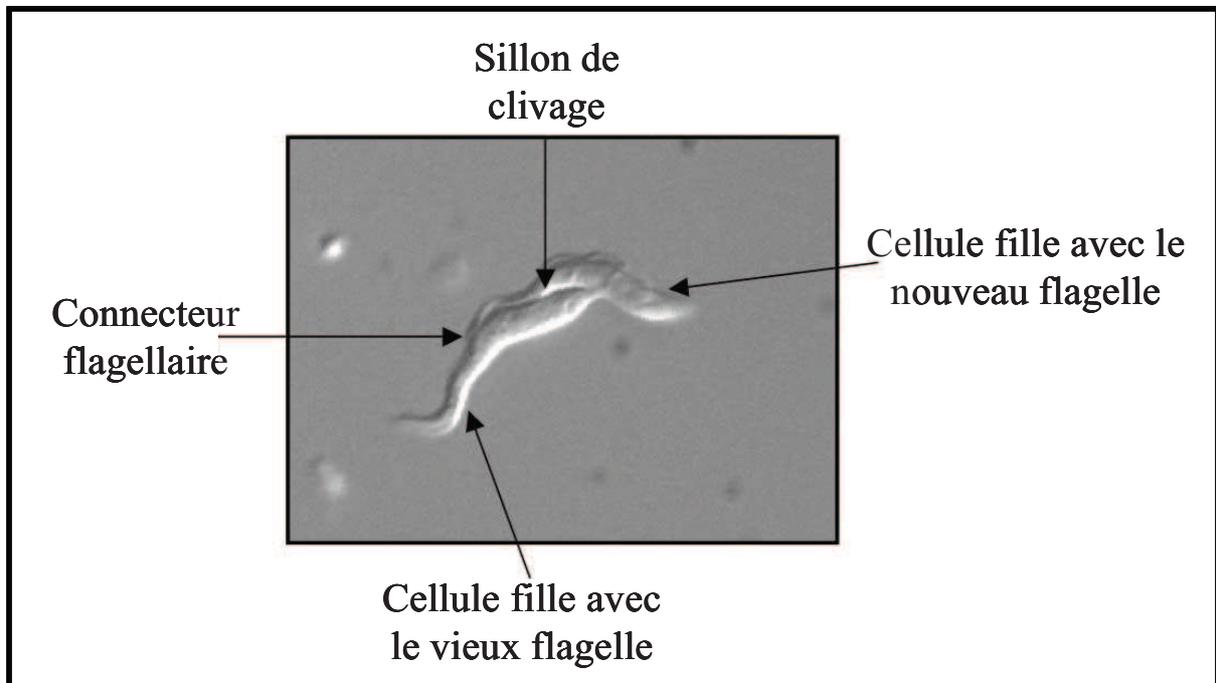


Figure 13: Image d'un Trypanosome en division cellulaire.

Image montrant des cellules filles avec nouveau / ancien flagelle et le sillon de clivage qui finira par les séparer.

(Adapté de McKean *et al.*, 2003)

L'élongation du flagelle est un événement crucial pour le bon déroulement du cycle cellulaire car il intervient dans l'initiation du clivage des cellules filles. Une cellule fille trop courte sera ainsi générée dans le cas d'un flagelle trop court ; l'absence d'un des flagelles aboutirait à une séparation lente et difficile des deux cellules filles, mais dans le cas d'une absence des deux flagelles, il n'y a pas de séparation (Kohl *et al.*, 2003, Kohl *et al.*, 2005).

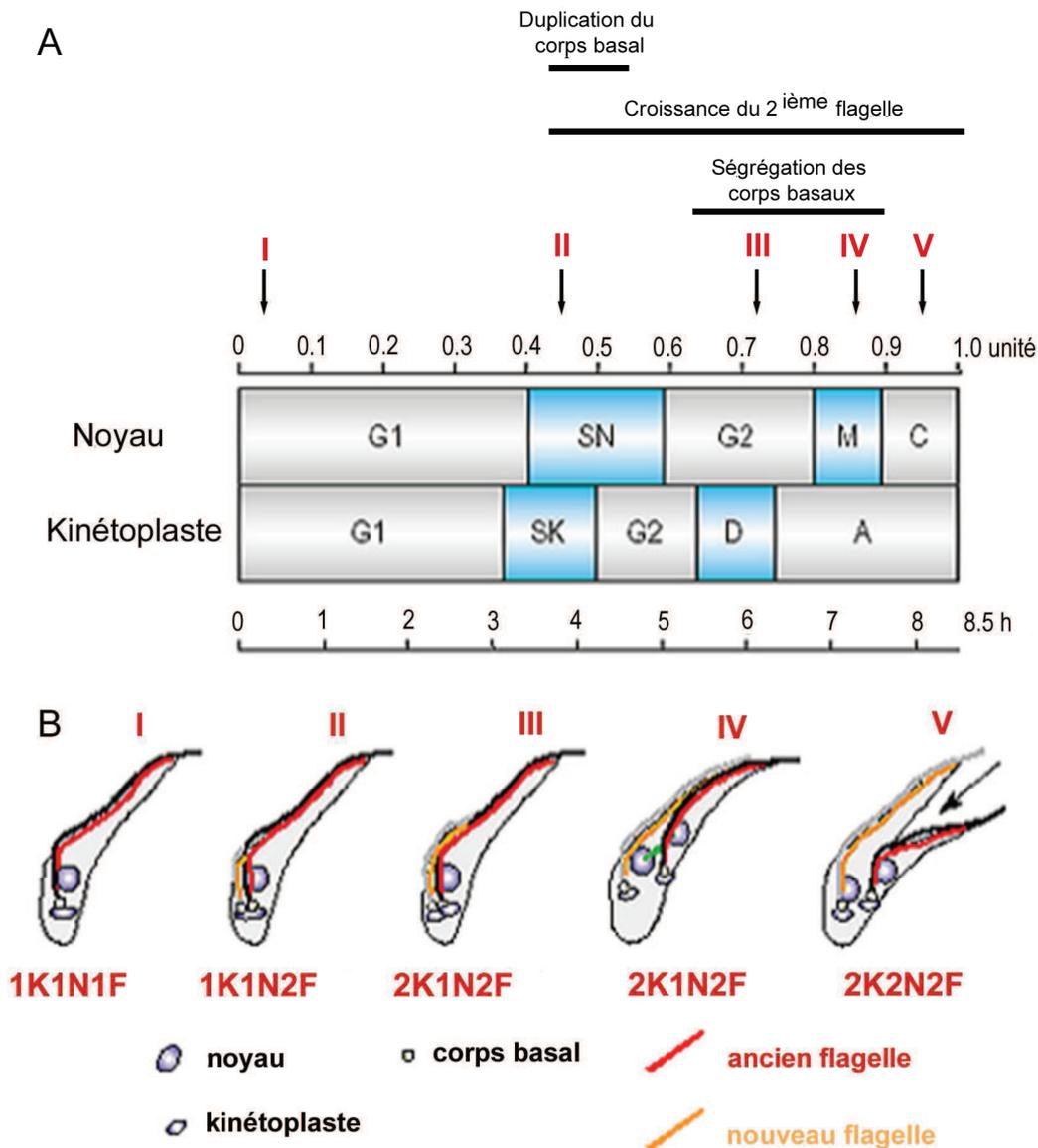


Figure 14 : Représentation schématique des événements morphologiques majeurs du cycle cellulaire de *T. brucei*.

A : Etapes et durées de la division du kinétoplaste et du noyau chez *T. brucei*. Le cycle du kinétoplaste commence avant celui du noyau mais est aussi plus court (SN = phase S du noyau; SK = phase S du kinétoplaste; D = duplication; A = apportioning = phase pendant laquelle les corps basaux continuent à migrer).

B : Représentation schématique de cellules de trypanosomes procycliques à différents points du cycle cellulaire. La flèche indique la direction et la position du sillon de division.

(Adapté de McKean, 2003)

Au cours du cycle cellulaire, la longueur totale du corps cellulaire augmente d'environ 6µm, soit environ 32% seulement. Etant donné la faible augmentation de la longueur de la cellule et l'arrangement linéaire de la plupart des organelles, il est clair qu'en plus de la duplication des organelles principaux, il doit se produire un repositionnement structural précis au cours du cycle cellulaire (Robinson *et al.*, 1995). Pour permettre ce repositionnement précis, il a été proposé que le noyau le plus antérieur est « attaché » à l'avant de la cellule, en relation avec le corps basal antérieur. Pendant ce temps, le corps basal postérieur s'éloignerait en même temps que l'élongation se ferait, permettant le positionnement spatial correct pour la « délivrance » ultérieure d'un des deux noyaux dans l'espace laissé libre, après la mitose (Robinson *et al.*, 1995). Cependant, la nature de cet éventuel attachement n'est toujours pas connue.

La figure 14 résume les différentes étapes du cycle cellulaire, kinétoplastique et nucléaire, dans sa globalité, ainsi que l'ordre de ces étapes, chez *T. brucei* (Ploubidou *et al.*, 1999, McKean, 2003).

La durée inhabituelle de la cytodierèse, en comparaison avec d'autres espèces eucaryotes, pourrait être due à la forme effilée de *T. brucei* avec une morphologie strictement contrôlée par le corset de microtubules sous-pelliculaires qui demeure intacte pendant tout le cycle cellulaire (Ploubidou *et al.*, 1999).

Chez *Leishmania* :

A l'inverse par exemple de *T. brucei* dont le déroulement du cycle cellulaire est connu et bien documenté depuis plusieurs années, chez *Leishmania*, le déroulement précis des étapes du cycle cellulaire n'a été bien étudié que très récemment.

Classiquement, il était établi que, en conditions naturelles, dans le phlébotome, le noyau des promastigotes, se divise complètement avant le kinétoplaste (Parrot *et al.*, 1927, Lumsden *et al.*, 1979). Généralement, les deux noyaux nouvellement formés restent côte-à-côte, alignés perpendiculairement à l'axe du corps cellulaire, n'étant alignés dans l'axe du corps que plus rarement. Puis, le corps cellulaire se divise en deux parts égales suivant un sillon longitudinal qui naît entre les deux flagelles et croît vers l'extrémité postérieure, laissant un noyau et un kinétoplaste dans chaque cellule fille (Lumsden *et al.*, 1979).

Cependant, dans les cultures de *Leishmania*, l'ordre de la division du noyau et du kinétoplaste peut être inversé (Christophers *et al.*, 1926, Adler, 1964). En effet, selon Adler (Adler, 1964), la division du kinétoplaste dans des promastigotes en culture commence quand le noyau est en

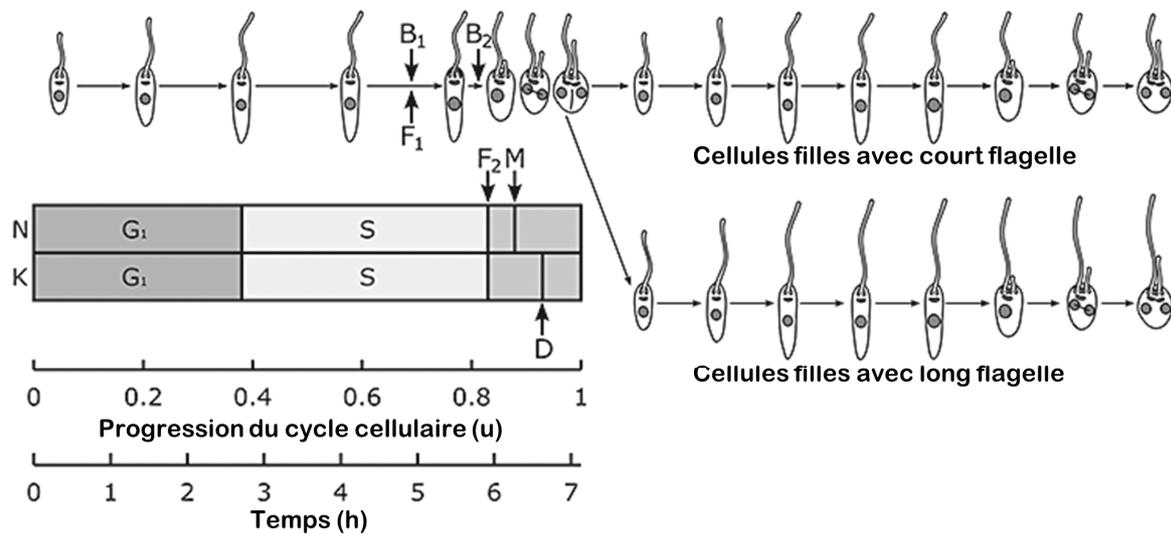


Figure 15: le cycle cellulaire des promastigotes de *L. mexicana*

En haut à gauche: représentation schématique des principales formes morphologiques survenant au cours du cycle cellulaire et leur durée approximative. La longueur cellulaire augmente durant la phase G₁, reste constante durant la phase S et diminue pour la division. La longueur du flagelle augmente durant G₁ et reste constante durant la phase S. le nouveau flagelle émerge de la poche flagellaire à la fin de la phase S mais la longueur du flagelle en division n'est pas égale entre une cellule fille avec un flagelle court (**en haut à droite**) et une cellule fille avec un long flagelle (**en bas à droite**). Les deux cellules filles continuent normalement leur progression dans le cycle cellulaire. Les temps approximatifs de formation du corps pro-basal (**B₁**), de la rotation du corps pro-basal (**B₂**) et du début de l'extension de l'axonème à partir du corps basal (**F₁**) sont indiqués.

En bas à gauche: résumé des temps de synthèse d'ADN et de division du noyau (N) et du kinétoplaste (K). Les phases S du kinétoplaste et du noyau sont synchrones et durent une grande partie du cycle cellulaire. M indique la ségrégation de l'ADN durant l'anaphase mitotique, D indique la division du kinétoplaste, F₂ indique l'émergence d'un nouveau flagelle de la poche flagellaire.

(Adapté de Wheeler et al, 2011)

prophase, continue durant la métaphase et est complétée durant l'anaphase, c'est-à-dire avant que la division du noyau soit complète (impliquant donc un stade de cellules à deux flagelles, deux kinétoplastes et un noyau, dites "2F2K1N").

A ce jour, grâce à deux études récentes sur le cycle cellulaire chez *L. mexicana* (Wheeler *et al.*, 2011) et chez *L. major* (Ambit *et al.*, 2011), les données sont plus précises.

Selon ces études, chez *Leishmania*, l'émergence d'un nouveau flagelle, précédé par la duplication du corps basal, constitue le premier événement aisément visible de la division cellulaire (Wheeler *et al.*, 2011, Ambit *et al.*, 2011). Globalement, le cycle de duplication du corps basal de *L. mexicana* suit un schéma similaire à celui observé chez *T. brucei* (Sherwin *et al.*, 1989) et chez *T. cruzi* (Elias *et al.*, 2007). L'apparition d'un nouveau flagelle survient durant la phase S du kinétoplaste (Wheeler *et al.*, 2011). Ce nouveau flagelle est habituellement plus court (jusqu'à 10µm) que l'ancien dont la longueur est très variable et continue d'augmenter au cours de cycles cellulaires successifs (Wheeler *et al.*, 2011). Cette observation est en contraste frappant avec ce qui est observé chez *T. brucei* où les longueurs des deux flagelles ancien et nouveau en division sont dans une fourchette de taille étroite (Tyler *et al.*, 2001). Bien que des travaux plus récents aient montré chez *T. brucei* l'existence d'une augmentation limitée de la taille du flagelle durant la phase G1 (Farr *et al.*, 2009), son ampleur reste bien moindre que celle observée chez *L. mexicana* (Wheeler *et al.*, 2011), indiquant des mécanismes différents de régulation de la taille du flagelle entre ces deux organismes.

A partir du stade "2F1K1N", l'ordre dans lequel la division du kinétoplaste et la mitose s'effectue est différent selon les auteurs et donc selon les espèces de *Leishmania*.

Chez les **promastigotes de *L. mexicana*** (cf. Fig.15) et de *L. donovani*, l'étape suivant l'émergence du nouveau flagelle est la mitose nucléaire (Havens *et al.*, 2000, Tammana *et al.*, 2010, Minocha *et al.*, 2011, Wheeler *et al.*, 2011) avec apparition de cellules 1K2N2F La division du kinétoplaste s'effectue ensuite, donnant naissance à des cellules 2K2N2F qui vont se diviser au cours de la cytotérièse pour donner deux cellules filles 1K1N1F qui pourront alors entamer un nouveau cycle de division (Wheeler *et al.*, 2011).

La durée du cycle cellulaire de *L. mexicana* est de 7,1 h (temps de doublement), les duplications du noyau et du kinétoplaste se produisent tard dans le cycle cellulaire après

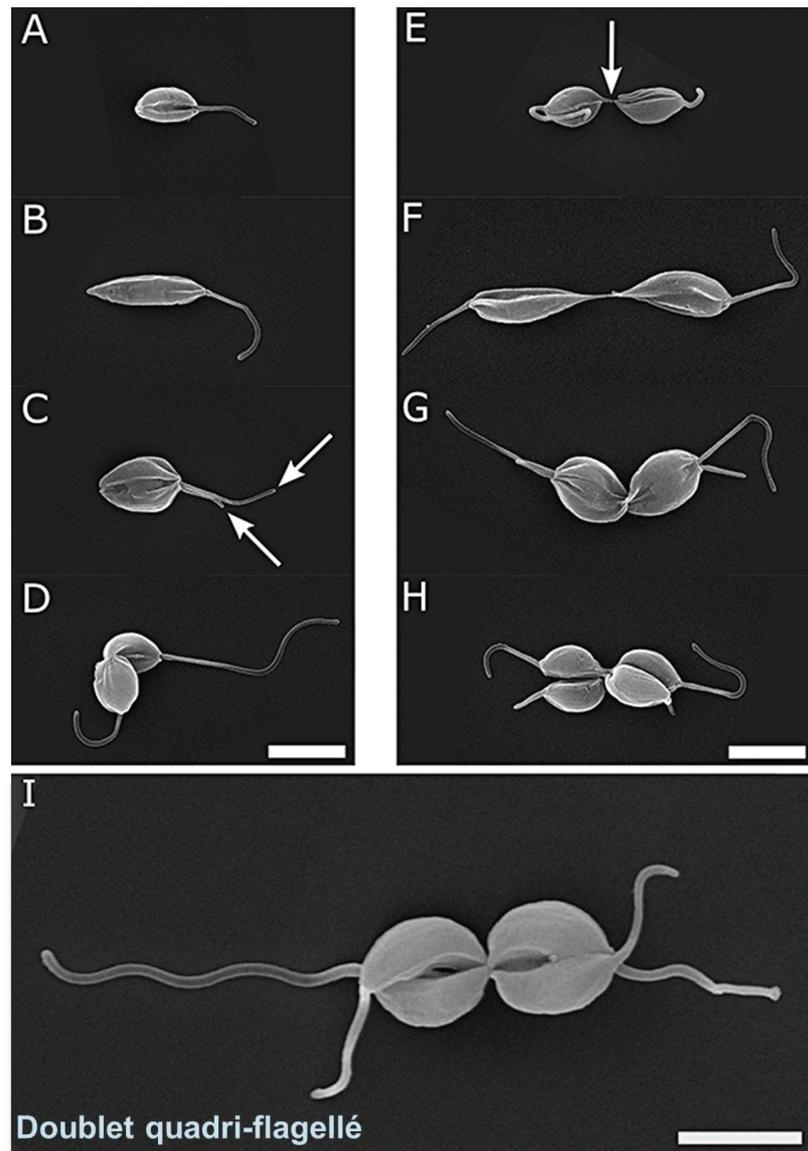


Figure 16: Promastigotes de *L. mexicana* par microscopie électronique à balayage.

A-D: Micrographies montrant les principales morphologies des cellules individuelles séparées. (C) montre une cellule avec deux flagelles (flèches) et (D) montre une cytotiérèse très tardive.

E-H: Micrographies montrant les principales morphologies de **doublets** qui correspondent approximativement aux morphologies cellulaires en A-D. La connexion postérieur-postérieur est indiquée par une flèche en (E). À noter que les cellules en (D) et en (E) sont morphologiquement indiscernables et on ne saurait prédire si elles resteront attachées ou si elles subiront l'abscission.

I: Un **doublet** quadri flagellé avec quatre flagelles de longueurs différentes bien visibles. (Les barres d'échelle représentent 5 μ m).

(Adapté de Wheeler et al, 2011).

l'émergence du nouveau flagelle qui s'effectue environ 6h après le début du cycle cellulaire. Ces données sont résumées dans la figure 15 (d'après (Wheeler *et al.*, 2011)).

Il est à noter qu'il existe environ 10% de doublets (2 cellules reliées par un mince pont cytoplasmique à leurs extrémités postérieures) dans la population cellulaire de promastigotes de *L. mexicana* en culture (cf. Fig.16). Ces cellules n'ont pas achevé l'abscission mais ont terminé la duplication de leurs organelles. Les doublets sont différents des rosaces, les deux cellules d'un doublet présentent toujours la même configuration K/N, indiquant qu'elles progressent de manière synchronisée dans le cycle cellulaire et d'une manière similaire à des cellules individuelles séparées (Wheeler *et al.*, 2011).

Chez les **promastigotes de *L. major***, après l'émergence d'un nouveau flagelle, il y a apparition de cellules $1N^M1K^D2F$ (D pour kinétoplaste en division et M pour noyau en mitose) (Ambit *et al.*, 2011). Dans ces cellules, l'élongation du fuseau mitotique intracellulaire suit d'abord un axe longitudinal puis est accompagné par la suite d'un mouvement rotationnel aboutissant à un positionnement latéral du noyau au sein de la cellule en division. Le fuseau mitotique reste ainsi toujours présent après la ségrégation du kinétoplaste, dans des cellules $1N^M2K2F$. Aucune cellule $2N1K2F$ n'est retrouvée par ces auteurs tout au long du cycle, contrairement aux observations de (Wheeler *et al.*, 2011) chez *L. mexicana*, ce qui indique que dans cette étude, la division du kinétoplaste se termine avant la fin de la mitose nucléaire (Ambit *et al.*, 2011). La figure 17 résume les étapes du cycle cellulaire de *L. major* et la figure 18 montre l'organisation dans le temps de ces différentes étapes.

Chez *L. major* comme chez *T. brucei*, le désassemblage du fuseau mitotique semble être concomitant à la fin de la division nucléaire (Ogbadoyi *et al.*, 2000), tandis que chez la plupart des cellules de mammifère, des restes de fuseau mitotique sont toujours présents après la fin de la caryodiérèse (Scholey *et al.*, 2003). En outre, on observe que la cytodiérèse est initiée principalement à la partie antérieure de la cellule, entre les deux flagelles, et suit un axe longitudinal vers l'extrémité postérieure de la cellule, ce qui correspondrait mieux en effet à un modèle de ségrégation du kinétoplaste survenant avant la fin de la mitose (Ambit *et al.*, 2011).

Des changements de morphologie de la cellule interviennent en parallèle, la longueur de la cellule augmentant progressivement tout au long du cycle cellulaire. La cellule croît d'abord en longueur avec un contenu en ADN constant (phase G1), puis la synthèse d'ADN commence et l'ADN est dupliqué tandis que la longueur de la cellule reste constante (phase S). Enfin, la cellule va diminuer en longueur en gardant un contenu en ADN doublé (phase

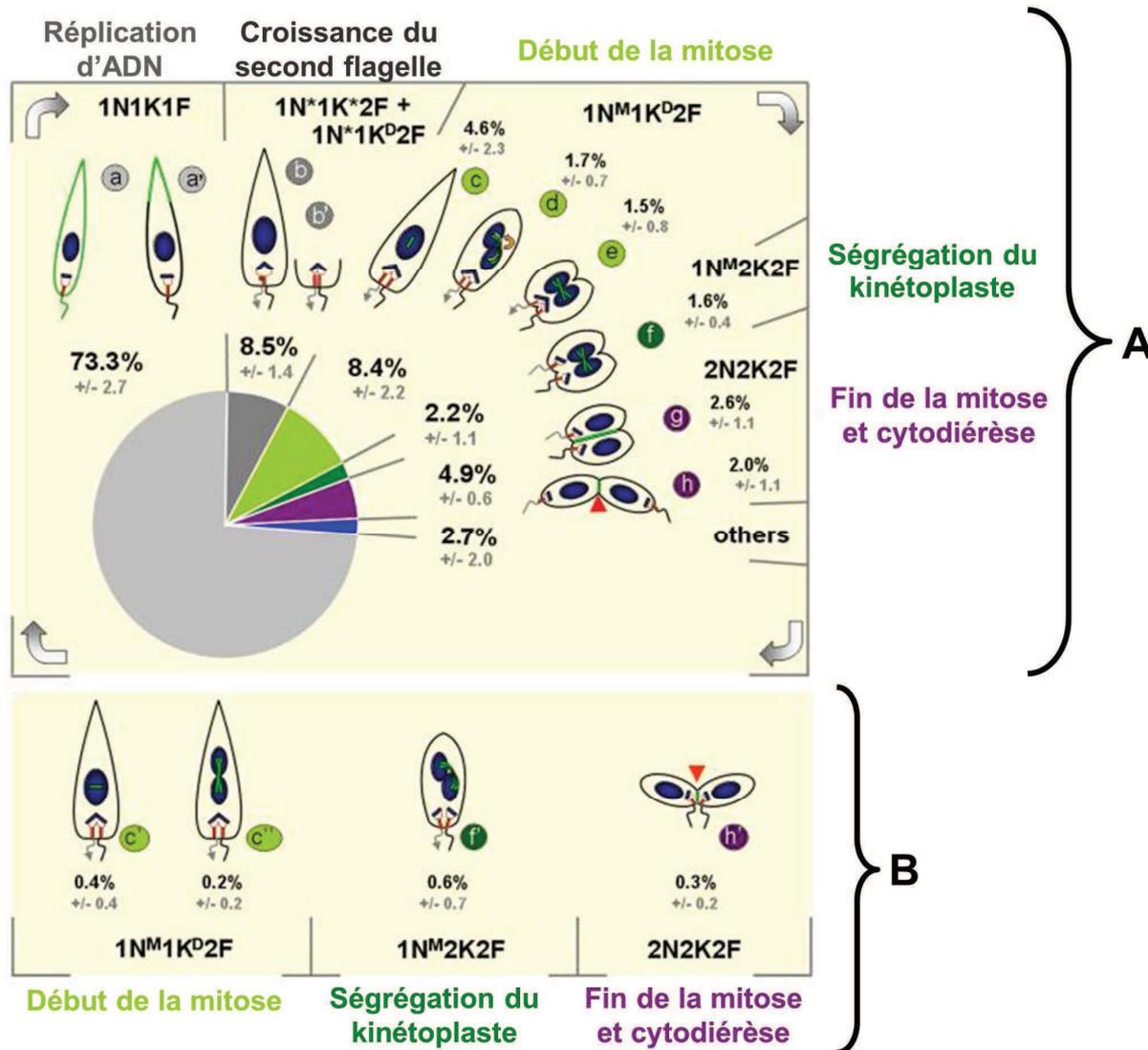


Figure 17: Représentation schématique du cycle cellulaire des promastigotes de *L. major*.

Les résultats présentés sont les moyennes de 3 expériences indépendantes réalisées sur les promastigotes de type sauvage *L. major* dont 1.500 cellules ont été comptées. Pour chaque cellule, le nombre de noyaux (N), de kinétoplastes (K), et de flagelles (F) a été enregistré. Les astérisques traduisent les organelles en phase S ou G2, M pour mitose nucléaire et D pour division du kinétoplaste. Les cellules avec des configurations similaires ont ensuite été regroupées (configurations a à h'). Les pourcentages de ces populations dans le nombre total de cellules sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type. Les cellules classées «others» pour «autres» possèdent une configuration rare ou sont des cellules en doublets ou des clusters. Le **panneau A** présente une version simplifiée du cycle cellulaire des promastigotes où seules les configurations les plus abondantes de cellules sont présentées. Le **panneau B** montre les configurations qui ont été omises dans le panneau A à cause de leur faible abondance.

(Adapté de Ambit et al, 2011)

G2 et S) jusqu'à la cytodièrese (Ambit *et al.*, 2011).

Le tableau 5 résume l'ensemble des données sur la durée des événements nucléaires du cycle cellulaire de *L. major*, *L. mexicana*, *T. brucei* et *T. cruzi*.

Dans l'ensemble, la succession des événements conduisant à la division du kinétoplaste et du noyau chez *L. major* ressemble à celle observée chez *T. brucei*. Deux différences majeures, cependant, sont observées chez *T. brucei*. La première est le déplacement antéropostérieur du kinétoplaste puis du noyau, qui obéit à un ordre strict et donc à des mécanismes moléculaires, et en particulier moteurs, précis. La seconde est observée durant la cytodièrese. Si, chez ces deux parasites la cytodièrese progresse longitudinalement, chez *T. brucei* elle comporte l'irruption d'un sillon de clivage qui progresse hélicoïdalement pour s'adapter à la présence du flagelle attaché, alors que pour les promastigotes de *L. major* (et *L. mexicana*), la cytodièrese s'effectue suivant un axe médian par l'intermédiaire d'un mécanisme encore non caractérisé, précédé par l'arrondissement des cellules (Hammarton *et al.*, 2007, Wheeler *et al.*, 2011, Ambit *et al.*, 2011) (Cf. Fig.19).

		Proportion du cycle cellulaire (durée correspondante en heure)			
Espèces		<i>L. major</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>
Temps de génération		10.2h	7.1h	8.5h	24h
Phases du cycle	G1	0.75 (7.7h)	0.38 (2.7h)	0.40 (3.4h)	0.45 (10.8h)
	S		0.4 (2.9h)	0.18 (1.5h)	0.10 (2.4h)
	G2	0.22 (1.8h)		0.36 (8.6h)	
	M	0.14 (1.4h)	0.17 (1.2h)	0.08 (0.7h)	0.02 (0.4h)
	C	0.11 (1.1h)	0.05 (0.4h)	0.12 (1.1h)	0.07 (1.8h)

Tableau 5 : Durée des événements nucléaires du cycle cellulaire chez *L. major*, *L. mexicana*, *T. brucei* et *T. cruzi*.

La durée des événements nucléaires est indiquée en termes de proportion du cycle cellulaire et en heures (M = Mitose; C = Cytodièrese).

(D'après (Woodward *et al.*, 1990, Elias *et al.*, 2007, Wheeler *et al.*, 2011, Ambit *et al.*, 2011))

E.3. Liens et points de contrôle entre les divers événements du cycle cellulaire

L'existence, chez les Trypanosomatidés, de deux phases S et de deux événements de ségrégation de génomes (noyau et kinétoplaste), suivis par une cytodièrese, soulève des questions sur la nature des relations de dépendance et des points de contrôle qui gouvernent ces événements au cours du cycle cellulaire.

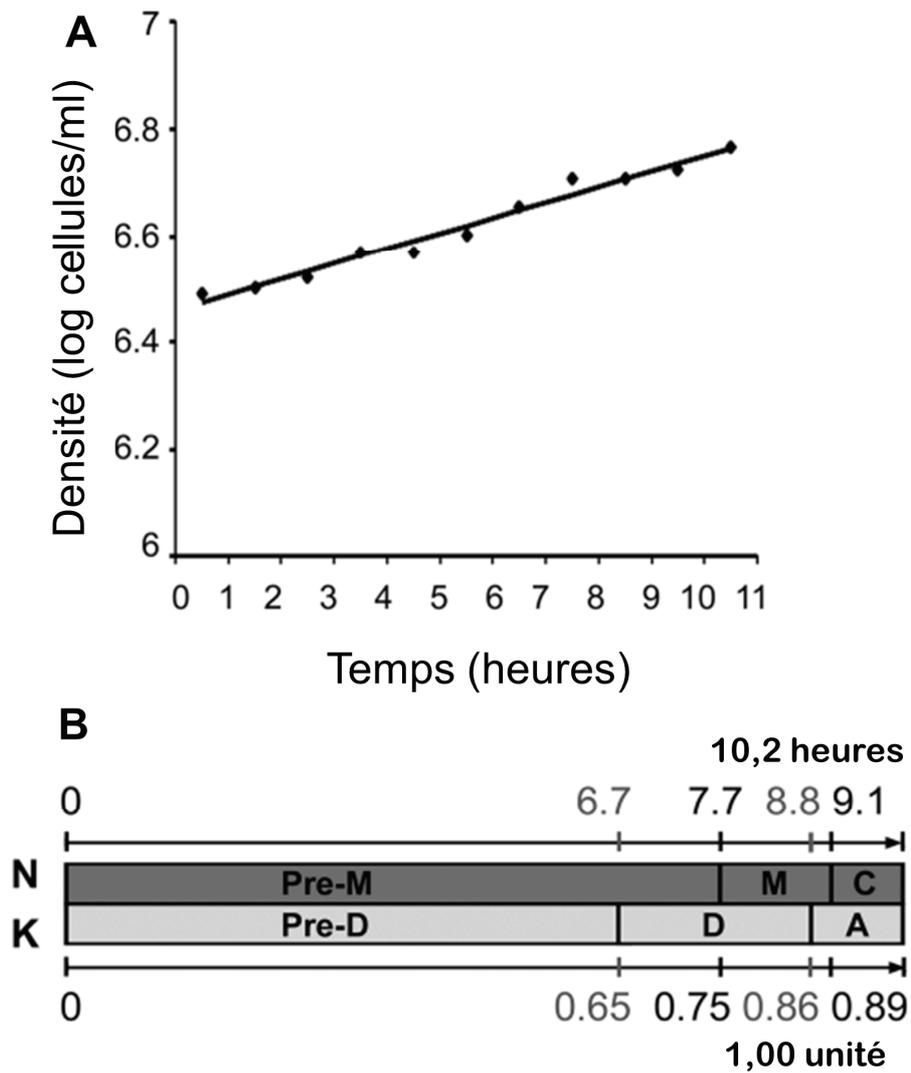


Figure 18: Timing des différentes phases du cycle cellulaire des promastigotes de *L. major*.

A : Courbe de croissance des promastigotes de *L. major* en culture. La densité cellulaire a été mesurée toutes les heures. Le temps de génération a été calculé et déterminé à 10,2 h.

B : Résumé des temps calculés (indiqués en heures [ligne du haut] et en fractions de 1 [ligne du bas]). La séquence des phases **pré-M**, **M** et **C** pour le noyau (**N**) et **pré-D**, **D**, et **A** pour le kinétoplaste (**K**), est représentée comme une carte linéaire du cycle cellulaire des promastigotes de *L. major*.

(Adapté de *Ambit et al, 2011*).

De plus, il est important de souligner la complexité évidente de la division cellulaire chez ces protozoaires, en raison d'une part de la complexité intrinsèque de certains de ces processus (réplication du réseau kinétoplastique, duplication d'une mitochondrie unique, duplication coordonnée du "corset" de microtubules...) et d'autre part de la nécessité de stricte coordination de ces événements (entre autres l'initiation de la réplication de l'ADN nucléaire et de l'ADN kinétoplastique et la formation du pro-corps basal).

Quelques rappels sur les éléments moteurs du cycle cellulaire et son contrôle chez les mammifères :

Eléments moteurs

De manière générale, le cycle cellulaire dépend de l'activation ou de la désactivation séquentielle de **CDKs** (*Cyclin-Dependent Kinases*). Il s'agit de sérine-thréonine kinases qui ne sont fonctionnelles que lorsqu'elles sont associées à une **cycline**, via la boîte cycline ou *cyclin box*, d'environ 100 acides aminés, de cette dernière (Kobayashi *et al.*, 1992) Il faut noter que les cyclines ne possèdent pas d'activité enzymatique. Les cyclines dites « START » atteignent leur pic d'expression en phase G1 (il s'agit des cyclines C et D) ou à la transition G1/S (cycline E). Les cyclines dites mitotiques (cyclines A et B) ont leur pic d'expression en G2/M (Pines *et al.*, 1990) Les complexes cycline/CDK induisent différents processus responsables du cycle cellulaire. L'inactivation de ces complexes, par dégradation de la cycline après ajout d'une chaîne d'ubiquitines et destruction par le protéasome, permet la sortie des événements du cycle cellulaire.

Contrôle

Le cycle cellulaire est soumis à un contrôle très strict afin d'obtenir un minimum d'anomalies cellulaires. Ainsi, tout problème au sein de la cellule va entraîner l'arrêt du cycle cellulaire. Dans les cellules eucaryotes supérieures, les signaux qui arrêtent le cycle agissent habituellement au point de contrôle G1.

Les centres organisateurs des microtubules (COMTs) mitotiques, chez les Trypanosomatidés

Les **centres organisateurs de microtubules** (COMTs) associés au fuseau de division mitotique et permettant la division cellulaire constituent une structure peu connue chez les Trypanosomatidés. Celle-ci n'est, en effet, similaire ni au centrosome des Eucaryotes supérieurs, ni aux pôles du fuseau mitotique (SPB pour *Spindle Pole Body*) des levures. Les composants de ce COMT associé au génome nucléaire sont inconnus, mais la tubuline γ , composant conservé des COMTs, co-localise avec les pôles du fuseau, suggérant que, bien

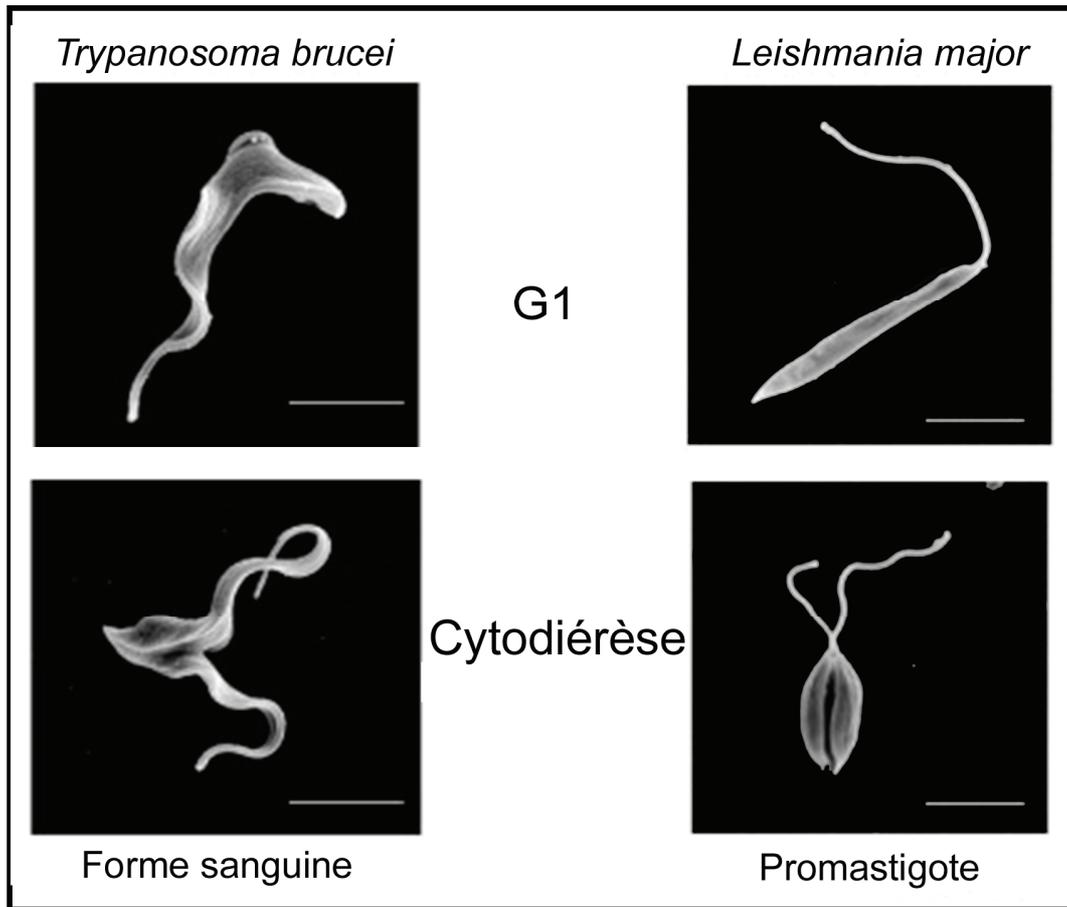


Figure 19: Images par microscope électronique à balayage des cellules de *T. brucei* et de *L. major* en phase G1 et en cytotiérèse (images de L Tetley et G Patuzzi, Université de Glasgow). Barre d'échelle: 10 μ m.

(Adapté de Hammarton et al, 2007)

que différent des centrosomes des cellules de vertébrés et du SPB des levures, le principe d'organisation des microtubules est similaire.

Eléments moteurs du cycle cellulaire, chez les Trypanosomatidés : les CRKs

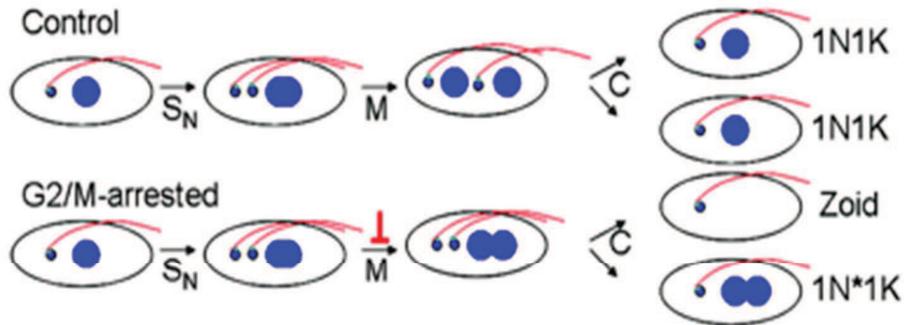
Plusieurs protéines, chez les Trypanosomatidés, ont été identifiées bio-informatiquement par leur homologie de séquence avec les CDKs. Le nom de **CRKs** (pour *Cdc2-Related Kinases*) leur a été donné. Toutes contiennent tous les domaines et résidus caractéristiques de la famille des Sérine/Thréonine protéines kinases, ainsi que les motifs-clefs associés aux CDKs, dont les motifs **PSTAIRE** (site de fixation des cyclines) et l'équivalent des résidus de régulation Thr14, Tyr15 et Thr161 (Hammarton *et al.*, 2003b). Ceci suggère que la fixation des cyclines doit jouer un rôle régulateur important dans l'activité des CRKs et que ces dernières seraient sous contrôle post-traductionnel de manière similaire aux CDKs des autres organismes, c'est-à-dire *via* des kinases et phosphatases activant positivement ou négativement. Cependant, il existe plusieurs changements dans la séquence d'acides aminés entourant les sites de phosphorylation, qui pourraient être importants pour la reconnaissance du substrat. En outre, plus de la moitié des CRKs possèdent des insertions dans le domaine catalytique kinase et la plupart ont des extensions N- ou C-terminales ; les motifs PSTAIRE, bien que reconnaissables, sont divergents ; et plusieurs CRKs ont des substitutions d'acides aminés aux positions T161, T14 et Y15 (Hammarton *et al.*, 2003b). Tout ceci suggère que d'autres mécanismes ont évolué pour réguler l'activité des CRKs chez les Trypanosomatidés.

En tout, onze CRKs (dont CRK3) et onze cyclines (dont CYC6, une cycline mitotique) ont été identifiées chez les Trypanosomatidés. CRK3 joue un rôle important dans le contrôle de la transition G2/M chez les trypanosomes, un rôle effectué en collaboration avec des protéines auxiliaires (Tu *et al.*, 2004). CYC6 quant à elle est la cycline indispensable dans le contrôle du passage G2/M dans les formes procycliques et sanguines de *T. brucei* (Hammarton *et al.*, 2003a, Li *et al.*, 2003). De plus il a été montré que le complexe CRK3/CYC6 qui se fixe à p12^{Cks1} (un homologue de la protéine de fission de levure p13^{Suc1}) est requis pour initier le passage à travers le point de contrôle G2/M dans les formes procycliques (Li *et al.*, 2003) et sanguines (Hammarton *et al.*, 2003a) de *T. brucei*.

Liens entre le cycle associé au kinétoplaste et au flagelle et la cytotérière.

Le traitement de trypanosomes procycliques et sanguins avec de l'acide okadaïque (inhibiteur hautement spécifique et réversible des phosphatases PP1 et PP2A) provoque une inhibition de

A: Formes procycliques



B: Formes sanguines

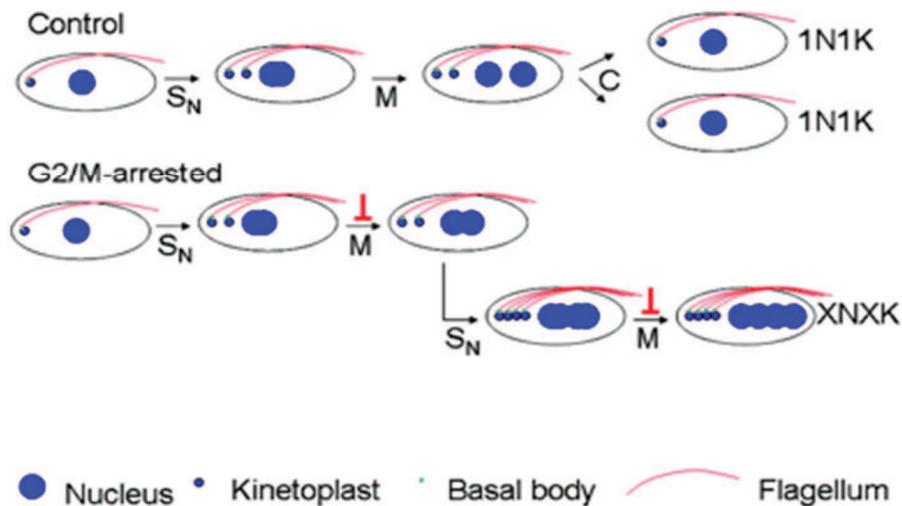


Figure 20 : Représentation schématique montrant les réponses différentes des formes procycliques et sanguines de *T. brucei* à un arrêt en G2/M.

SN = phase S nucléaire ; M = mitose ; C = cytodierèse

(Extrait de Tu and Wang, 2005).

L'arrêt en G2/M des formes procycliques de *T. brucei* induit la formation de zoïdes et de cellules 1N1K, indiquant que ces cellules ne possèdent pas le point de contrôle du cycle cellulaire qui empêche l'initiation de la cytodierèse en l'absence de mitose. Par contre, des cellules avec de nombreux noyaux et kinétoplastes apparaissent après arrêt en G2/M des formes sanguines de *T. brucei*. Ces dernières ne possèdent donc pas le point de contrôle empêchant une nouvelle entrée en phase S avant la fin de la cytodierèse et de la phase G1.

la croissance et une accumulation de cellules multinucléées avec un seul réseau mitochondrial relativement gros et, très souvent, un deuxième flagelle plus petit (Das *et al.*, 1994). Autrement dit, la mitose et la division nucléaires se sont déroulées alors que la ségrégation du kinétoplaste et la cytodierèse ont été inhibées en présence de la drogue. Cela laissait penser que la ségrégation du kinétoplaste et la cytodierèse sont liées chez le trypanosome, alors que phase S/mitose et cytodierèse ne le sont pas. Un point de contrôle doit ainsi réguler l'entrée en cytodierèse *via* le contrôle de la division du kinétoplaste et sa séparation.

De plus, la ségrégation du kinétoplaste est intimement liée à la duplication du corps basal et donc au flagelle (Robinson *et al.*, 1991). Or, plusieurs auteurs ont montré un lien entre le corps basal et la cytodierèse, en inhibant, chez *L. donovani* et chez *T. brucei*, l'expression de la centrine, protéine associée à la duplication et à la ségrégation des Centre Organisateur de Microtubules (COMTs) chez les Eucaryotes supérieurs (Selvapandiyar *et al.*, 2004, Selvapandiyar *et al.*, 2007), en surexprimant la protéine TbNRKC associée au corps basal (Pradel *et al.*, 2006), ou en inhibant plusieurs éléments du protéome du flagelle chez *T. brucei* (LaCount *et al.*, 2002, Broadhead *et al.*, 2006). De plus, comme il a été vu dans la section E.2, la FAZ semble permettre l'établissement de la position du sillon de clivage. On peut donc penser que le lien entre flagelle/kinétoplaste et cytodierèse est assuré par cette FAZ, du moins chez *T. brucei*. Enfin, la présence du flagelle est physiquement nécessaire à la cytodierèse (Ralston *et al.*, 2006), et également bien entendu à la mobilité du parasite (synthèse dans (Hammarton *et al.*, 2007)).

Points de contrôle.

Chez les formes sanguines de *T. brucei*, différentes expériences d'ARN interférence ciblant CYC6 (Hammarton *et al.*, 2003a), GPI8, sous-unité catalytique d'un complexe qui ajoute des ancras GPI sur les polypeptides naissants (Lillico *et al.*, 2003), CRK3 (Tu *et al.*, 2004) ou d'autres protéines du cycle cellulaire, provoquent l'augmentation de cellules 1N2K et l'apparition de cellules avec plusieurs flagelles, plusieurs noyaux non séparés et plusieurs kinétoplastes bien ségrégués. Dans ces cellules, la mitose n'est pas complète (absence de caryodierèse) et la cytodierèse a été bloquée mais pas la réplication/ségrégation du kinétoplaste. Ces données montrent que, dans la forme sanguine, le point de contrôle empêchant une nouvelle entrée en phase S avant la fin de la cytodierèse et de la phase G1 est absent ou a été inactivé par l'inhibition de l'expression de la protéine d'intérêt. Enfin, cela

Phénotype	Forme procyclique	Forme sanguine
Cytodiérèse en l'absence de mitose	Oui	Non
Ségrégation et division du kinétoplaste en l'absence de mitose	Oui	Oui
Ré-initiation de la phase S nucléaire en l'absence de mitose	Non	Oui
Ré-initiation de la division du K en l'absence de mitose	Non	Oui

Tableau 6 : Principaux points de contrôle du cycle cellulaire dans les formes sanguines et procycliques de *T. brucei*.

indique clairement que la division et la ségrégation du kinétoplaste ne sont pas suffisantes pour l'initiation de la cytodiérese dans les formes sanguines de *T. brucei*, même si ces deux évènements semblent fortement liés, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent.

Au contraire, dans les formes procycliques de *T. brucei*, l'absence d'ARNm de *CYC6* (Hammarton *et al.*, 2003a) ou *CRK3* (Tu *et al.*, 2004) entraîne l'apparition de zoïdes (cellules sans noyau et avec un seul kinétoplaste). Lors de cette expérience, les cellules, bloquées avec deux kinétoplastes et un seul (gros) noyau (2K1N) ont donc subi la cytodiérese mais sans réaliser de cycles ultérieurs de réplication du kinétoplaste ou de l'ADN nucléaire. Elles se sont divisées en une cellule 1N1K et une cellule 0N1K. Par conséquent, les formes procycliques de *T. brucei*, contrairement aux formes sanguines, ne possèdent pas le point de contrôle du cycle cellulaire qui empêche l'initiation de la cytodiérese en l'absence de division nucléaire, point de contrôle présent chez les autres Eucaryotes connus. Enfin, le cycle de ségrégation du kinétoplaste seul semble entraîner la forme procyclique de *T. brucei* dans la division cellulaire (Tu *et al.*, 2004). D'autres expériences sont en accord avec ce lien cycle de ségrégation du kinétoplaste et du corps basal / cytodiérese, notamment le traitement des cellules à la rhizoxine et à l'aphidicoline (Ploubidou *et al.*, 1999) ou encore les expériences de (Li *et al.*, 2003, Tu *et al.*, 2004, Tu *et al.*, 2005) où la cytodiérese est complétée dans des cellules arrêtées en G1 et en G2/M.

Le tableau 6 et la figure 20 récapitulent les régulations du cycle cellulaire évoquées ci-dessus, chez *T. brucei*. Il est clair qu'il existe des différences fondamentales dans le contrôle du cycle cellulaire entre les différentes formes de *T. brucei* et que des points de contrôle clefs du cycle cellulaire présents chez les Eucaryotes supérieurs sont absents chez les trypanosomes.

Les différentes expériences citées ci-dessus montrent également que, bien que les cycles cellulaires du noyau et du kinétoplaste soient précisément synchronisés, et donc probablement étroitement liés, ils restent indépendants. En effet, la réplication du kinétoplaste peut être bloquée sans inhiber la mitose (Das *et al.*, 1994), de même le kinétoplaste peut se répliquer de façon répétée en l'absence même de mitose (Hammarton *et al.*, 2003a).

Par ailleurs, l'inhibition par ARN interférence, dans la forme sanguine de *T. brucei*, de la synthèse des VSG (*Variant Surface Glycoproteins*) entraîne, *in vitro*, l'arrêt de la division des parasites en précytodiérese en 2K2N, avec deux flagelles entiers et deux poches flagellaires mais sans sillon de division profond. Suite à ce blocage, la cellule n'initie pas une autre phase

S ou une autre mitose. Autrement dit, un point de contrôle du cycle cellulaire, spécifique, capable de vérifier la synthèse des VSG et bloquant la cytodivision a été activé (Shedden *et al.*, 2005). Ceci pourrait permettre au parasite d'éviter une dilution excessive du manteau protecteur de VSG en l'absence de synthèse de ces protéines, en permettant un temps d'attente pour corriger les fluctuations de cette synthèse.

En conclusion, chez les Trypanosomes, les événements du cycle cellulaire sont strictement coordonnés, mais il n'existe pas de « vérification » continue que l'événement précédent est terminé avant de commencer le suivant, contrairement à ce qui se passe chez les eucaryotes classiques. Les Trypanosomes présentent une complexité importante au niveau du contrôle du cycle cellulaire, non observée chez d'autres eucaryotes unicellulaires tels que la levure (Van Hellemond *et al.*, 2000). Il est possible que des mécanismes moléculaires particuliers aient évolué pour accompagner les nombreuses autres spécificités moléculaires et cellulaires de ces parasites.

E.4. Lien cycle cellulaire/différenciation

Dans les années 90, l'hypothèse était émise qu'il existerait, chez *T. brucei*, un lien entre la différenciation cellulaire, qui accompagne le passage des trypanosomes du Mammifère à la mouche tsé-tsé, et la division cellulaire (Matthews *et al.*, 1994a, Matthews *et al.*, 1994b). Plus précisément, les auteurs pensaient qu'il existait une position dans le cycle cellulaire, en G0 ou en G1, à laquelle les cellules étaient réceptives aux signaux de différenciation et qu'une ré-entrée et une progression dans le cycle cellulaire étaient nécessaires à cette différenciation (Matthews *et al.*, 1994a).

Cependant, les cellules sanguines de *T. brucei* arrêtées par de l'hydroxy-urée (HU) (blocage des cellules en M/G1) (Mutomba *et al.*, 1996), de l'aphidicoline (blocage en G2/M) (Mutomba *et al.*, 1996) ou de la lactacystine (blocage en G2/M et G1/S) (Mutomba *et al.*, 1998) sont toujours capables de se différencier en formes procycliques *in vitro*. Le processus de différenciation ne semble ainsi ni spécifique d'un stade cellulaire, ni dépendant du déroulement du cycle cellulaire chez *T. brucei*, même si différenciation et progression dans le cycle coïncident dans le temps.

Apparemment, la seule nécessité pour initier la différenciation est une baisse de température

de 37°C à 26°C et la présence des acides tricarboxyliques citrate et cis-aconitate (Bass *et al.*, 1991, Mutomba *et al.*, 1995), ces changements induisant probablement des régulations post-transcriptionnelles responsables de la différenciation.

En conclusion de cette première partie introductive, nous retiendrons que leishmanioses et trypanosomiasés constituent un fléau de santé publique. Maladies tropicales dites négligées, elles touchent presque exclusivement des populations démunies des pays en développement. Contre ces maladies aucun vaccin n'est disponible, les traitements existants sont non seulement en quantité insuffisante mais aussi en général toxiques, sans oublier le problème des chimiorésistances qui se développent. En dehors de l'intérêt médical évident que représente l'étude de ces pathogènes (avec pour objectif l'éradication ou du moins la diminution de l'impact sur les populations), *Leishmania* et *T. brucei* représentent, en raison de leurs particularités cellulaires, biochimiques et moléculaires évoquées ci-dessus, des modèles de choix pour étudier différents mécanismes biologiques. Ces particularités peuvent en effet être exploitées pour le développement d'outils thérapeutiques spécifiques des parasites qui ne modifient pas le fonctionnement de la cellule hôte mammifère. De plus, ces organismes présentent de nombreux avantages en recherche fondamentale : *T. brucei* a par exemple été choisi comme modèle cellulaire d'étude de l'ARN interférence pour plusieurs raisons : l'ARNi y est très efficace, ce fut l'une des premières espèces où l'ARNi a été démontrée (Bastin *et al.*, 1998, Ngo *et al.*, 1998, Bastin *et al.*, 2000a), et depuis, de nombreux gènes ont été ciblés par cette technique.

Ces organismes eucaryotes unicellulaires sont aussi un modèle de choix pour l'étude des régulations génétiques post-transcriptionnelles, puisque le contrôle de l'expression génétique s'effectue majoritairement à ce niveau (Clayton, 2002). De plus, ce sont des organismes simples à manipuler et à maintenir en culture, et leur génome est entièrement séquencé. La génomique fonctionnelle y est par ailleurs remarquablement bien développée, l'absence d'introns facilitant en effet l'identification et le clonage des gènes.

F. "Les" protéasomes.

F.1. La protéolyse cellulaire.

Les protéines sont continuellement renouvelées dans tous les types de cellules, ce qui implique des processus permanents de synthèse et de dégradation (protéolyse). Ces processus ont pour but, d'une part, d'éviter les risques d'accumulation de protéines défectueuses qui perturberaient gravement le fonctionnement cellulaire, et, d'autre part, d'assurer un recyclage des acides aminés. La protéolyse cellulaire ou dégradation des protéines, processus hautement sélectif et finement régulé, est ainsi l'un des processus les plus essentiels à la survie de cellule. La cellule dispose de trois options pour la dégradation de ses protéines, chacune impliquant un jeu spécifique d'enzymes de dégradations (protéases) : dégradation des protéines par le protéasome, par le lysosome ou encore par l'autodestruction de la cellule entière par des caspases (phénomène d'apoptose) ou des phénomènes s'en rapprochant (autophagie par exemple).

En contrôlant le niveau des protéines clés dans la cellule, la protéolyse intervient dans la régulation de nombreux processus cellulaires (Hochstrasser, 1996, Hengge *et al.*, 2003) tels que le cycle cellulaire (Kirschner, 1999), l'oncogenèse (Mani *et al.*, 2005), le contrôle de la transcription (Ottosen *et al.*, 2002), le développement de la croissance (Zhang *et al.*, 2004), l'atrophie musculaire (Franch *et al.*, 2005) et la présentation de peptides antigéniques (Kloetzel, 2004). L'un des rôles les plus importants de la protéolyse est l'élimination des protéines anormales ou mal repliées (voir synthèse dans (Goldberg, 2003)). Il existe un système de contrôle de la qualité des protéines qui a pour but de prévenir l'accumulation des protéines défectueuses dans la cellule (Wickner *et al.*, 1999). Les chaperonnes fonctionnent étroitement avec les protéases, et forment avec elles le système de "contrôle qualité" des protéines en éliminant les protéines défectueuses. Les protéines anormales sont donc éliminées par l'action des chaperonnes qui les aident à retrouver leur conformation native et par la machinerie protéolytique qui les élimine définitivement.

Les protéases représentent des constituants majeurs dans la cellule et se répartissent en deux groupes selon leur besoin ou non en énergie. On distingue les protéases ATP-dépendantes et les protéases ATP-indépendantes. Les protéases ATP-indépendantes interviennent notamment dans les fonctions dites « de ménage ». Leur rôle est en particulier de réaliser l'étape finale de la protéolyse en dégradant en acides aminés les petits oligopeptides issus de la protéolyse

Protéase	Organisme / localisation	Nombre de gènes	Mode de clivage
Protéasome	Eucaryote / cytoplasme, noyau	>32	Ntn Hydrolase
Protéasome	Archaeobactérie / cytoplasme	Entre 2 et 4	Ntn Hydrolase
HslVU	Bactérie / cytoplasme	2	Ntn Hydrolase
	Trypanosomatidés * / mitochondrie *	3*	
ClpAP	Bactérie / cytoplasme	2	Sérine endopeptidase
ClpXP	Bactérie / cytoplasme	2	Sérine endopeptidase
ClpCP	Bactérie / cytoplasme, stroma des chloroplastes	2	Sérine endopeptidase
Lon (La)	Bactérie / cytoplasme	1	Métallopeptidase
Pim1 (Lon)	Mitochondrie / matrice	1	Métallopeptidase
Lon	Archaeobactérie / membranaire ?	1	Métallopeptidase
FtsH	Bactérie / membrane interne	1	Métallopeptidase
FtsH	Archaeobactérie / cytoplasme	1	Métallopeptidase
i-AAA	Mitochondrie / membrane interne	1	Métallopeptidase
m-AAA	Mitochondrie / membrane interne	1	Métallopeptidase

Tableau 7 : Distribution des protéases ATP-dépendantes.

Les protéases ATP-dépendantes sont réparties en quatre familles distinctes en fonction de l'homologie des séquences des sous-unités protéolytiques. * : Dans la famille des protéasomes on retrouve le complexe HslVU, d'abord décrit uniquement chez les bactéries, puis plus récemment découvert chez des protozoaires parasites tels que les Trypanosomatidés et les Apicomplexes tels que *Plasmodium*, ... (Couvreur *et al.*, 2002, Gille *et al.*, 2003, Ruiz-Gonzalez *et al.*, 2006), chez les Trypanosomatidés le complexe HslVU est codé par 3 gènes au lieu de 2 comme chez les bactéries. Cette famille comprend aussi le système protéasome des Eucaryotes qui représente le système protéolytique le plus complexe connu à ce jour ; les protéines qui le constituent sont codées par plus de 32 gènes différents. (Tableau adapté de (Schmidt *et al.*, 1999)).

dépendante de l'énergie. Les protéases ATP-dépendantes quant à elles interviennent essentiellement dans la dégradation des protéines dites régulatrices et dans l'élimination des protéines défectueuses. L'inhibition ou l'inactivation de la majorité des protéases ATP-dépendantes entraîne une sensibilité au stress et l'accumulation des protéines défectueuses dans le cytoplasme. La majorité de ces protéases sont induites en condition de stress (Etlinger *et al.*, 1977, Goff *et al.*, 1985, Kroh *et al.*, 1990, Heinemeyer *et al.*, 1991, Chuang *et al.*, 1993b, Hecker *et al.*, 1996, Bush *et al.*, 1997, Jelinsky *et al.*, 1999, Kruger *et al.*, 2000).

F.2. Les protéases ATP-dépendantes

F.2.1. Distribution

Les protéases ATP-dépendantes ont été identifiées dans tous les organismes et dans les trois domaines du vivant : Eubactéries, Archaeobactéries et Eucaryotes (voir synthèse dans (Schmidt *et al.*, 1999)). Elles ont été classées en quatre familles selon l'homologie de séquence de leurs sous-unités protéolytiques : la famille Lon, la famille Clp, la famille FtsH et la famille du protéasome (Tableau 7, adapté de (Schmidt *et al.*, 1999)).

Chez les Bactéries, il existe cinq classes de protéases ATP-dépendantes. Ces protéases incluent : le système ClpAP, le système ClpXP, la protéase Lon, la protéase membranaire FtsH et la protéase ClpYQ ou HslVU qui s'apparente au protéasome par son mode de clivage et sa structure générale (voir synthèse dans (Gottesman, 2003)).

Chez les Eucaryotes, le protéasome est l'acteur principal de la protéolyse ATP-dépendante cytosolique. Le protéasome eucaryote constitue le système protéolytique le plus complexe découvert jusqu'à présent avec 32 gènes différents qui codent pour les sous-unités du complexe (voir synthèse dans (Coux *et al.*, 1996, Glickman *et al.*, 2002)).

La co-existence de la protéase HslVU et du protéasome 20S est retrouvée chez certains Eucaryotes comme certains protozoaires parasites (*Leishmania*, *Trypanosoma*, *Plasmodium...*) (Couvreur *et al.*, 2002, Gille *et al.*, 2003). Les gènes HslU et HslV ont par ailleurs été découverts dans de nombreux autres lignages eucaryotes différents (Ruiz-Gonzalez *et al.*, 2006).

Chez les Archaeobactéries, le protéasome a été découvert dans le cytoplasme (Dahlmann *et al.*, 1989). Ce protéasome représente une version "simplifiée" du protéasome eucaryote.

F.2.2. Caractéristiques et fonctions

Bien que les protéases ATP-dépendantes ne présentent pas toutes une homologie significative au niveau de la séquence primaire, ni en ce qui concerne le mode de clivage des protéines, elles présentent plusieurs caractéristiques communes, notamment leur assemblage en de larges complexes multimériques « compartimentés » formés par l'association d'un complexe protéolytique et d'un complexe régulateur de type ATPasique. Les sites actifs responsables de la protéolyse sont confinés au sein d'une chambre protéolytique. C'est cette architecture « compartimentée » qui confère à la protéolyse sa spécificité et sa dépendance à l'ATP pour la dégradation d'un substrat.

La ressemblance au niveau de l'architecture des protéases ATP-dépendantes a été soulignée pour la première fois en 1995 lorsque les données structurales du complexe protéolytique ClpP d'*E.coli* et du protéasome 20S archéobactérien ont été établies (Kessel *et al.*, 1995, Lowe *et al.*, 1995). En effet, ces deux protéases présentent la même structure quaternaire "en tonneau" que celle du protéasome 20S : ClpP est formée par l'agencement de deux anneaux heptamériques, et le protéasome 20S est formé par l'agencement de quatre anneaux. C'est une structure auto-compartmentée où les sites actifs sont confinés à l'intérieur d'une chambre dont l'ouverture ne dépasse pas quelques nanomètres de diamètre (Lupas *et al.*, 1997, De Mot *et al.*, 1999). L'accès aux cavités internes de ces protéases est généralement réservé à de petits peptides ou à des protéines complètement dénaturées capables de passer à travers les pores.

Le complexe protéolytique par lui-même a donc une activité peptidase limitée ; il a besoin, pour dégrader des protéines natives, d'interagir avec une autre machinerie capable de reconnaître les protéines et de les déplier, pour les rendre accessibles aux sites catalytiques. Ces dernières machineries protéiques se présentent sous forme de complexes ATPasiques qui s'associent aux complexes protéolytiques afin de « réguler » leur activité (d'où leur nom fréquemment employé de complexes régulateurs). Ces complexes peuvent être partiellement (complexe régulateur 19S du protéasome eucaryote) ou complètement formés de sous-unités ATPasiques (ClpA, ClpX, HslU, PAN). Dans le cas de FtsH et Lon, l'activité ATPase est liée à un domaine intégré dans le complexe lui-même (Chung *et al.*, 1981, Suzuki *et al.*, 1997, Stahlberg *et al.*, 1999). Les domaines ou sous-unités ATPasiques sont les régulateurs de l'activité protéolytique portant des activités de type chaperonne moléculaire. Elles appartiennent à la grande famille des protéines AAA+ (ATPase Associated with various cellular Activities) qui utilisent l'énergie de l'ATP pour mener des fonctions de dépliement et de désassemblage (Neuwald *et al.*, 1999, Vale, 2000, Lupas *et al.*, 2002).

Etant donné que le protéasome 20S existe exclusivement chez les Eucaryotes, chez certaines Archaeobactéries et chez certains Actinomycètes, chez les autres Eubactéries, la fonction du protéasome 20S est assurée par des protéases ATP-dépendantes. Chez *E. coli*, de nombreuses protéases ont été identifiées, appartenant à la famille des HSP100/Clp. Ces protéases ont un rôle important dans la tolérance à la température élevée, dans la protéolyse de substrats cellulaires et dans la régulation de la transcription (Neuwald *et al.*, 1999, Ogura *et al.*, 2001). La protéase La (Lon) est l'une de ces protéases. C'est une ATPase composée de 4 sous-unités identiques de 87 kDa.

L'autre protéase importante est la protéase Clp. Contrairement à La, elle se présente sous forme d'un gros complexe hétéro-oligomérique constitué d'une sous-unité ATPase/chaperone régulatrice (ClpA, ClpB, ClpC, ClpX) et d'une sous-unité protéolytique (ClpP). Chez certaines bactéries, la fonction du protéasome est assurée par l'assemblage des protéases ClpA et ClpP. Ce complexe présente une configuration en tonneau et est constitué d'un centre protéolytique entouré de sous-unités ATPases comme le protéasome 26S (Kessel *et al.*, 1995). Les protéases Clp ont été conservées au cours de l'évolution.

F.3. Le système protéasome

C'est en 1980 que le protéasome fut décrit pour la première fois (Wilk *et al.*, 1980). Alors extrait de l'hypophyse bovine, ce complexe protéique de 700 kDa est constitué de sous-unités de poids moléculaire allant de 24 à 28 kDa et présente une activité peptidasique en C-terminal de résidus hydrophobes, acides et basiques (Edmunds *et al.*, 1982). Ce n'est qu'en 1982 qu'Arrigo et collaborateurs montrent que ce complexe protéolytique, mis en évidence dans de nombreuses cellules eucaryotes, et le prosome, hypothétique facteur de transcription, correspondent à une seule et même entité. Les deux complexes sont alors baptisés « protéasome » pour les activités protéasiques (Arrigo *et al.*, 1988).

Le protéasome est donc un complexe multicatalytique présent sous diverses formes chez toutes les espèces vivantes allant de certaines Eubactéries, telles que plusieurs espèces d'Actinomycètes, aux Eucaryotes supérieurs, en passant par les Archaeobactéries (Volker *et al.*, 2002, Gille *et al.*, 2003).

Le protéasome 20S est un complexe protéasique essentiel à la cellule vivante, représentant 1% des protéines cellulaires (Tanaka *et al.*, 1986). Chez la plupart des Eucaryotes, il est présent à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme (Wojcik *et al.*, 2003, Janse *et al.*, 2004). Il a

également été découvert chez quelques Procaryotes : *Rhodococcus erythropolis* (Eubactérie) (Tamura *et al.*, 1995), *Thermoplasma acidophilum* (Archaeobactérie) (Dahlmann *et al.*, 1989) et chez toutes les Archaeobactéries actuellement séquencées (Maupin-Furlow *et al.*, 2000). Il constitue la principale voie de dégradation des protéines cellulaires intrinsèques et de toutes les protéines à demi-vie courte telles que les cyclines, les kinases (Glutzer *et al.*, 1991, Hershko *et al.*, 1991, Pagano *et al.*, 1995), les facteurs de transcription (Fan *et al.*, 1991, Palombella *et al.*, 1994, Alvarez-Castelao *et al.*, 2005) et les enzymes des voies de transduction qui interviennent dans la régulation de certains processus biologiques. Associé au réticulum endoplasmique, il dégrade également les protéines anormales, malformées ou inutiles, pouvant être toxiques pour la cellule.

Cette activité de dégradation est régulée par deux co-facteurs, PA700 (19S) et PA28 (11S), qui s'associent indépendamment et de façon spécifique au protéasome 20S. En présence d'ATP, un ou deux complexes régulateurs 19S se fixent de façon stable aux extrémités du protéasome 20S pour former le protéasome 26S. Ce protéasome est impliqué dans la voie de dégradation spécifique des protéines, dégradant uniquement les protéines marquées à l'ubiquitine (Ferrell *et al.*, 2000).

Le complexe 11S, appelé PA28, est également capable de se lier au protéasome 20S. Il augmente ainsi cinquante fois l'activité protéasique du 20S. Ce complexe intervient surtout dans l'hydrolyse de petits peptides. Chez les Eucaryotes supérieurs, un certain nombre de ces peptides sont utilisés par le système immunitaire (Rechsteiner *et al.*, 2000). C'est ainsi que le protéasome contribue à la conservation de l'intégrité cellulaire.

F.3.1. Le protéasome des Eucaryotes

F.3.1.1. Structure du protéasome 20S

Le protéasome 20S est le cœur protéolytique des différentes formes de protéasome. Cependant, bien que le protéasome 20S seul puisse hydrolyser de petits peptides et certaines protéines dépliées, il ne peut pas dégrader de véritables substrats poly-ubiquitinylés, pour lesquels il a besoin d'être associé à son régulateur 19S (Groll *et al.*, 2003b).

L'architecture du protéasome 20S est conservée de la Bactérie à l'Homme. C'est un complexe multi-protéique d'environ 700 kDa. Sa structure a été déterminée par microscopie électronique

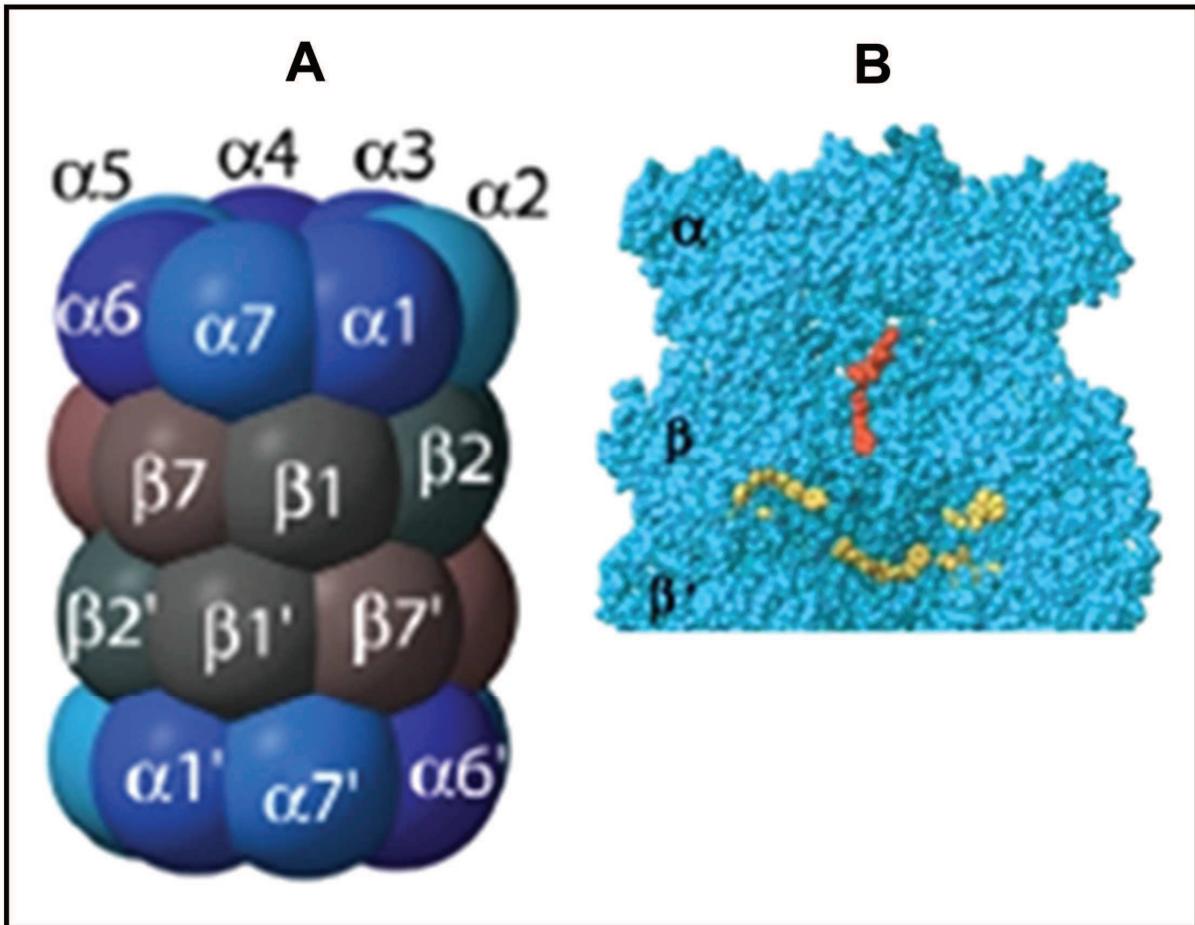


Figure 21 : Structure du protéasome 20S.

A : Vue schématique latérale. (Adapté de Rechsteiner & Hill, 2005).

B : Vue en coupe, montrant les sites actifs $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ en jaune et le potentiel site actif $\beta 7$ en rouge. (Adapté de Unno et al, 2002).

puis par cristallographie (Groll *et al.*, 1997), ce qui a révélé un cylindre creux, de 15 nm de long et de 11 nm de diamètre, composé de 28 sous-unités de masses moléculaires similaires de 20 à 30 kDa, assemblées en 4 anneaux heptamériques distincts, identiques 2 à 2, et empilés dans une symétrie C2 (c'est-à-dire avec un axe de rotation d'ordre 2, avec 2 protomères reliés par des rotations de 180°C). Les deux anneaux externes sont formés de 7 sous-unités α et les deux anneaux internes de 7 sous-unités β (Coux *et al.*, 1996), les sous-unités β portant les activités catalytiques (Fig. 21) (Rechsteiner *et al.*, 2005).

Les 7 sous-unités α et 7 sous-unités β sont différentes mais présentent de fortes homologues de séquences (suivant une stœchiométrie $\alpha 1-7\beta 1-7\beta 1-7\alpha 1-7$). Les deux anneaux internes bêta délimitent la cavité interne, tandis que les cavités externes (appelées "antichambres") sont délimitées par les anneaux alpha. Cette structure favoriserait la rétention des substrats à l'intérieur du cylindre et jouerait de ce fait un rôle déterminant dans la processivité du protéasome.

Seules 3 des 7 sous-unités β ($\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$) possèdent une activité protéolytique (Groll *et al.*, 1997), ce qui signifie que chaque protéasome possède 6 sites catalytiques (Fig. 21b, représentés en jaune) (Unno *et al.*, 2002). Le clivage des liaisons peptidiques est assuré par une attaque nucléophile de la thréonine N-terminale des sous-unités β . Cependant, les sites catalytiques présentent des spécificités distinctes, définies par la nature physico-chimique de l'environnement des sites actifs. Ainsi, les sous-unités $\beta 2$ qui présentent un environnement acide où vont se loger des résidus basiques, possèdent une activité trypsin-like qui coupe après les résidus basiques. Les sous-unités $\beta 5$ possèdent une activité chymotrypsin-like qui coupe après les résidus hydrophobes. La troisième activité est appelée PGPH (PeptidylGlutamyl Peptide-Hydrolyzing) et coupe après les acides aminés acides (Orlowski *et al.*, 1991). Et la dernière activité, portée par les sous-unités $\beta 1$, l'activité « post-acide », également appelée activité caspase-like, coupe également après les résidus acides (Kisselev *et al.*, 1999). Ces dégradations génèrent en général des peptides de 7 à 9 acides aminés. En réalité, le protéasome 20S possède au moins 5 activités peptidases (Orlowski, 1993), bien qu'il soit difficile de toutes les identifier à l'aide de substrats et d'inhibiteurs différents. Cependant, les mécanismes de dégradation restent obscurs du fait qu'il n'existe aucune corrélation entre ces activités et les sites de clivage (Wenzel *et al.*, 1994). On suppose que l'environnement agit directement sur les sites catalytiques pour réguler les activités.

Comparé au protéasome eucaryote, celui des Archaeobactéries et des Eubactéries ne possède qu'une activité, de type chymotrypsine (Dahlmann *et al.*, 1989).

Les sites catalytiques du protéasome Eucaryotes sont localisés à l'intérieur du complexe, sur les sous-unités β . Cette organisation permet d'isoler les sites actifs des protéines cellulaires afin d'éviter leur dégradation accidentelle. Le protéasome présente ainsi une forme de séparation spatiale déjà mentionnée plus haut et typique des protéases procaryotes (Eubactéries, Archaeobactéries), l'auto-compartmentation (Baumeister *et al.*, 1998), qui existe donc également chez les Eucaryotes dont la plupart des activités protéasiques sont confinées dans des compartiments cellulaires telles que les lysosomes (Lupas *et al.*, 1997).

Le protéasome des Eucaryotes ne compte donc que 6 sous-unités β actives sur 14 (chez *Thermoplasma* ou *Rhodococcus*, le nombre de sites actifs est de 14). Ces sites utilisent le groupement hydroxyle du résidu thréonine N-terminal comme nucléophile pour attaquer les liaisons peptidiques des protéines. De ce fait, le protéasome 20S est classé dans un autre type de protéase, appelé *N terminal nucleophile hydrolases* ou Ntn hydrolases (Brannigan *et al.*, 1995).

Les sous-unités α n'ont pas d'activité protéolytique ; néanmoins, elles régulent l'accès des protéines à la chambre catalytique (voir plus bas). Elles jouent également un rôle important dans l'assemblage des protéasomes 20S, 26S et 20S/11S. Isolées, elles sont capables de former des anneaux. L'assemblage des anneaux α est nécessaire à la formation des anneaux β . De plus, les sous-unités α exposent à leur surface les sites de liaison aux co-facteurs (19S et 11S), indispensables à la formation du complexe 20S/11S et du protéasome 26S.

Chez les Eucaryotes, plusieurs protéines chaperonnes sont importantes pour l'assemblage des anneaux alpha et bêta, et pour la formation du protéasome 20S. Les sous-unités β possèdent une pro-séquence N-terminale, qui est clivée par autocatalyse pendant la formation du complexe, cette pro-séquence est requise pour l'incorporation des sous-unités et pour l'assemblage normal du protéasome 20S. Le clivage de cette pro-séquence est également nécessaire à leur activité protéolytique, car il permet d'exposer le résidu thréonine engagé dans les activités catalytiques.

F.3.1.2. Ouverture du pore

Chez les Eucaryotes, les sous-unités α possèdent en N-terminal un motif fortement conservé qui limite l'accès des protéines à la chambre catalytique en contrôlant l'ouverture et la fermeture du canal ou pore du complexe; c'est ainsi que l'activité protéasique du complexe est régulée. Les extrémités N-terminales des sous-unités α forment ainsi un réseau

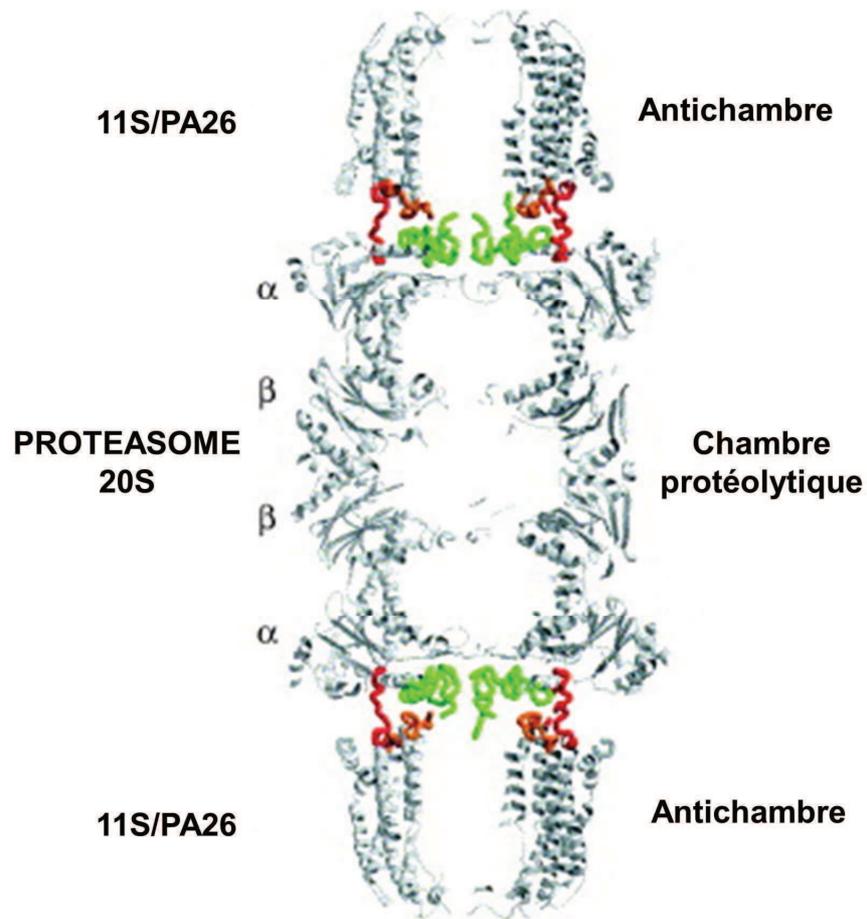


Figure 22 : Représentation en coupe de la structure du complexe 20S-11S.

Complexe chimérique constitué du 20S de levure et du 11S de *Trypanosoma brucei*. Les extrémités N-terminales des sous-unités alpha sont représentées en vert et les extrémités C-terminales du 11S sont représentées en rouge. D'après (Groll & Clausen, 2003).

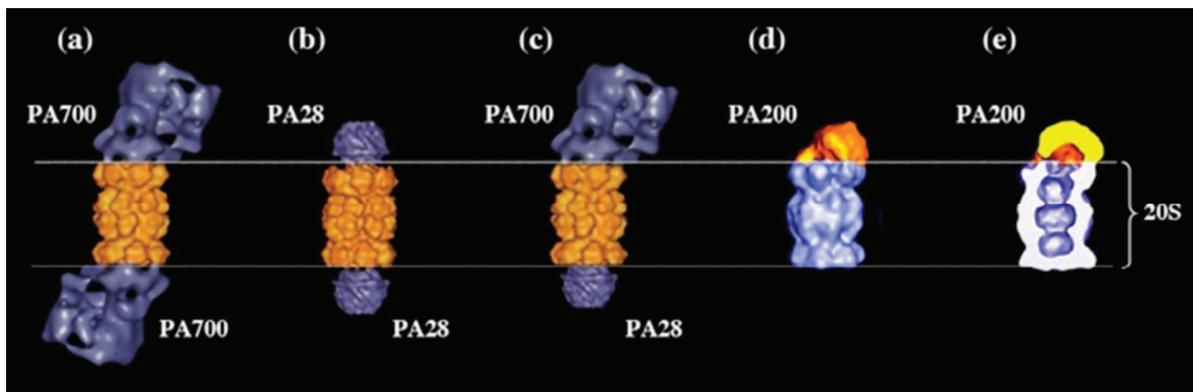


Figure23 : Protéasome 20S associé à ses différents activateurs.

Reconstitutions tridimensionnelles des structures obtenues en microscopie électronique (a, b et c, d'après (Baumeister *et al*, 1998), d et e d'après (Ortega *et al*, 2005)).

d'interactions et constituent une barrière physique qui obstrue l'entrée du canal et limite l'accès des protéines cytosoliques à l'intérieur de la chambre protéolytique en imposant une conformation fermée au protéasome (Groll *et al.*, 2000, Groll *et al.*, 2003b). La sous-unité $\alpha 3$ semble être particulièrement impliquée dans la fermeture du pore. En effet, son extrémité N-terminale forme une sorte de pont qui traverse le pore, et elle est en contact avec toutes les autres extrémités N-terminales. De plus, des analyses cristallographiques du protéasome 20S de *S. cerevisiae* ont montré que la délétion de l'extrémité N-terminale de la sous-unité $\alpha 3$ ouvre un canal vers la cavité catalytique interne du protéasome 20S, levant ainsi la répression de l'hydrolyse peptidique (Groll *et al.*, 2003a).

La structure cristallographique du complexe 20S-11S a permis de montrer que l'association du core protéolytique avec son activateur engendre un réarrangement des extrémités N-terminales des sous-unités α qui, ainsi, n'obstruent plus le pore, mais sont "dressées" à

l'intérieur de l'activateur, ce qui ménage un accès au canal du 20S (Fig. 22) (Groll *et al.*, 2003a).

F.3.1.3. Les différents régulateurs

Comme évoqué précédemment, il existe des activateurs du protéasome 20S, en absence desquels les extrémités du 20S sont fermées et l'activité du protéasome est réprimée (Baumeister *et al.*, 1998, Ortega *et al.*, 2005). Ces régulateurs positifs sont les complexes 19S (ou PA700), 11S (ou PA28), et PA200 (où PA signifie *Proteasome Activator*) qui, en s'associant aux extrémités du 20S, au niveau de l'anneau de sous-unités alpha, vont permettre l'ouverture des canaux et donc l'activation du 20S (Fig.23).

Les données structurales obtenues pour ces régulateurs du protéasome montrent qu'ils sont traversés par un pore ou un canal qui va se positionner dans le prolongement du canal du 20S. Pour PA28 (ou 11S), les données cristallographiques le montrent très clairement (Fig. 22 et 23b). En ce qui concerne PA200, des données de microscopie électronique prédisent un agencement en solénoïde dont le pore pourrait se positionner dans le prolongement du canal du 20S (Fig. 23e). Pour le 19S (ou PA700), cet agencement semble concerner au moins le sous complexe appelé "base".

Ces données de structure sont en faveur d'un rôle de ces activateurs dans la régulation du 20S. Néanmoins, seul le complexe 19S, associé au 20S, formant ainsi le protéasome 26S, est considéré comme étant impliqué dans la dégradation de substrats ubiquitylés ou non. Les autres régulateurs, PA28 et PA200, semblent jouer d'autres rôles puisqu'ils sont décrits

comme étant uniquement capables d'activer la dégradation de peptides par le protéasome 20S, mais pas celle de protéines.

PA28 α et PA28 β sont deux sous-unités de 28 kDa identiques à 50 %. Ces sous-unités s'associent pour former un hétéro-hexamère de 200 kDa appelé PA28 ou régulateur 11S, qui est capable de s'associer au 20S indépendamment de l'ATP. Cette réaction est réversible et le complexe se dissocie facilement en présence de faibles concentrations en sel. L'activité protéasique du 20S est stimulée par la sous-unité PA28 α , alors que PA28 β seul n'a aucun effet. Le complexe formé intervient surtout dans l'hydrolyse de petits peptides non marqués à l'ubiquitine (Ma *et al.*, 1992). Généralement, ces peptides sont destinés aux cellules présentatrices d'antigènes ayant un rôle majeur dans la réponse immunitaire. Chez les Eucaryotes, PA28 n'intervient pas dans la dégradation des protéines marquées à l'ubiquitine.

Le 19S (ou PA700) est constitué d'au moins 17 protéines. Chez les Archaeobactéries, la particule 19S a été découverte chez *Methanococcus jannaschii* (Wilson *et al.*, 2000). Elle apparaît essentielle pour la dégradation de certaines protéines. Chez les Eucaryotes, deux particules 19S s'assemblent au protéasome 20S pour former un complexe de 2,5 MDa appelé protéasome 26S (Voges *et al.*, 1999, Zwickl *et al.*, 1999). La particule 19S possède des activités ATPases et iso-peptidases ainsi qu'un site de liaison à l'ubiquitine. De ce fait, elle apporte de nouvelles propriétés au 20S : en effet, ce dernier compte désormais six sous-unités ATPases qui possèdent un domaine AAA essentiel et qui rendent la dégradation protéique ATP-dépendante. De plus, l'ATP est nécessaire à l'assemblage du protéasome 26S.

Ces données de structure sont en faveur d'un rôle de ces activateurs dans la régulation du 20S. Néanmoins, seul le complexe 19S (associé au 20S) est considéré comme étant impliqué dans la dégradation de substrats ubiquitylés ou non (Voges *et al.*, 1999). Les autres régulateurs, PA28 et PA200, semblent jouer d'autres rôles puisqu'ils sont décrits comme étant uniquement capables d'activer la dégradation de peptides par le protéasome 20S (Rechsteiner *et al.*, 2005), mais pas celle de protéines. Mais certains résultats laissent entrevoir d'autres rôles possibles.

En effet, des données récentes ont montré que le complexe PA28 γ , un des 3 membres de la famille PA28 (Kandil *et al.*, 1997, Tanahashi *et al.*, 1997), était impliqué dans la dégradation de protéines importantes pour le contrôle du cycle cellulaire (Murata *et al.*, 1999, Masson *et al.*, 2003, Barton *et al.*, 2004) ce qui remet en question le paradigme selon lequel seul le complexe 19S est le seul régulateur impliqué dans la dégradation des substrats. Par ailleurs,

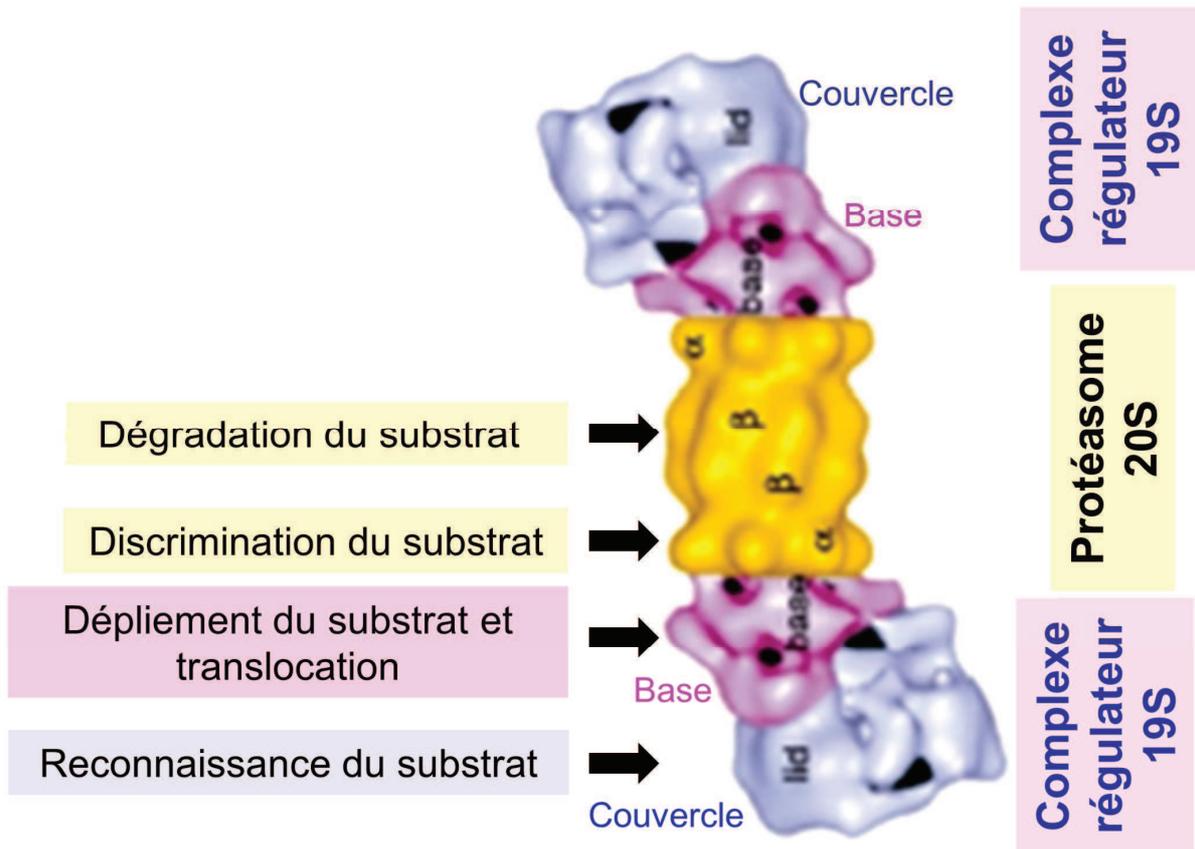


Figure 24 : Reconstruction de la structure du protéasome 26S à partir d'images de microscopie électronique montrant les différents sous-complexes et leur fonction.

D'après (Zwickl & Baumeister, 1999).

des formes hybrides du protéasome ont été identifiées où le 20S est associé à une extrémité à un complexe 19S et à l'extrémité opposée soit à PA28, soit à PA200. Dans ce contexte, PA28 et PA200 pourraient moduler l'activité du 26S, notamment en facilitant la sortie des peptides produits, suggérant que la stimulation concertée des activités protéolytiques et peptidolytiques pourrait optimiser la dégradation des substrats protéiques. De fait, PA28 $\alpha\beta$ stimule préférentiellement les 3 activités chymotrypsique-, trypsique- et caspase-like du protéasome, PA28 γ l'activité trypsique-like et PA200 l'activité caspase-like.

PA200 est le plus récent régulateur du protéasome à avoir été découvert (Ustrell *et al.*, 2002). Contrairement à PA28 $\alpha\beta$, qui est un complexe multimérique, PA200 est une protéine de 200 kDa qui agit sous forme de monomère. De par son homologie avec la protéine de levure Blm3p (maintenant connue comme Blm10p), dont les défauts confèrent une sensibilité à la bléomycine (agent provoquant des dommages à l'ADN), et son interaction avec la protéine

Sir4p (protéine qui répare les cassures d'ADN double-brin), un rôle de PA200 dans la réparation de l'ADN a été proposé, probablement *via* le recrutement des protéasomes au niveau des cassures double-brin (Ustrell *et al.*, 2002).

F.3.1.4. Le protéasome 26S

Le protéasome 26S, formé par l'association du corps catalytique 20S avec un ou deux complexes régulateurs 19S (Fig.24), est impliqué dans la dégradation des substrats, ubiquitylés ou non, dépendante de l'ATP (Voges *et al.*, 1999, Zwickl *et al.*, 1999). Le complexe régulateur 19S prend en charge plusieurs rôles dans la régulation de l'activité du protéasome : la reconnaissance des substrats (ubiquitylés ou non), la déubiquitylation des substrats ubiquitylés pour le recyclage de l'ubiquitine, la dénaturation des substrats, l'ouverture du canal et la translocation des substrats dans le 20S.

Composition et structure du 19S

Le complexe 19S n'a pas pu être cristallisé, ni seul, ni en association avec le 20S. Sa structure exacte n'est donc pas connue. De plus, le nombre exact des sous-unités du 19S dans les différents organismes est inconnu, car il n'est pas exclu que certaines sous-unités se lient transitoirement et/ou puissent être perdues en fonction des procédures de purification utilisées, qu'elles soient en quantité substœchiométrique ou encore qu'elles soient spécifiques

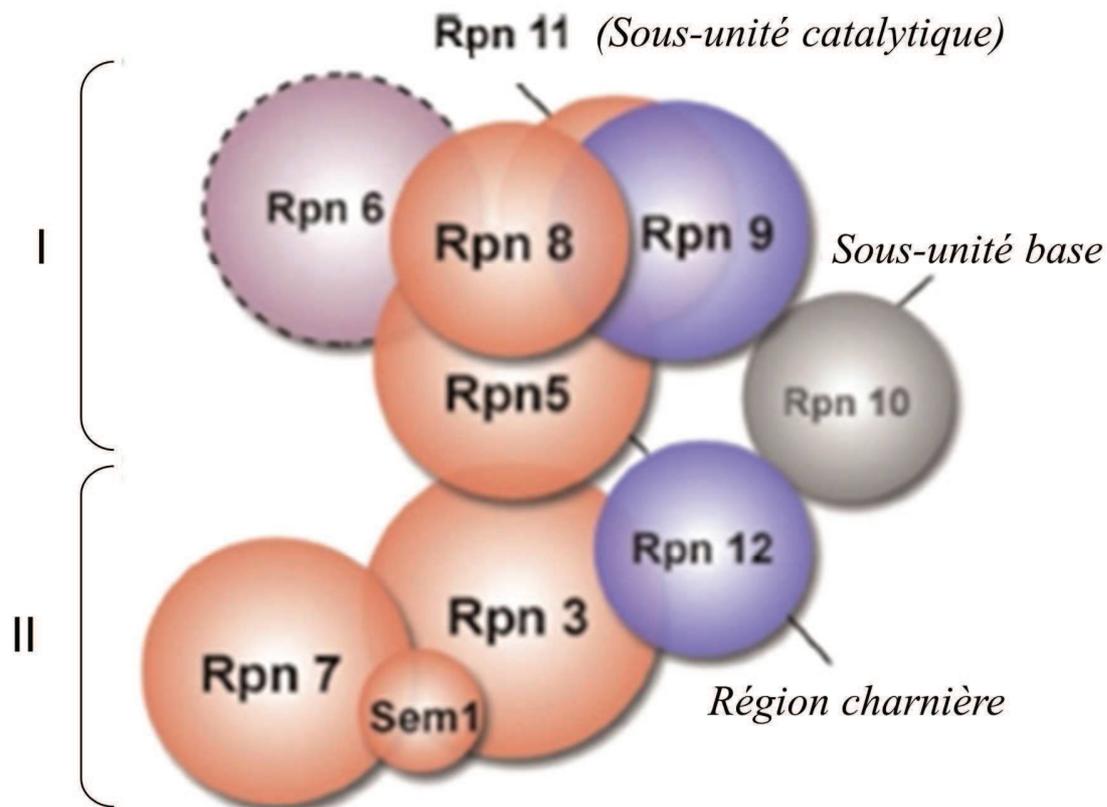


Figure 25 : Organisation supposée du couvercle du 19S.

Organisation en 2 sous-groupes : **I**, composé de Rpn5, Rpn6, Rpn8, Rpn9 et Rpn11, et **II**, composé de Rpn3, Rpn7, Rpn12 et sem1/Rpn15. L'interaction Rpn3-Rpn5 semble assurer le lien entre ces 2 sous-groupes. La sous-unité Rpn10 qui stabilise l'association base/couvercle semble interagir avec Rpn9 et Rpn12.

D'après (*Sharon et al, 2006*).

des espèces. Néanmoins, à quelques exceptions près, la composition des sous unités du 19S entre différentes espèces est remarquablement similaire. Pour désigner ces sous-unités, deux nomenclatures sont couramment utilisées, la nomenclature "S" des mammifères (où "S" signifie Subunit) et la "Rp" de *S. cerevisiae* (où "Rp" signifie Regulatory Particle) où l'on distingue les "Rpt" pour les ATPases et les "Rpn" pour les sous-unités non ATPases. Par ailleurs, la structure analysée par microscopie électronique, combinée à des études de mutagenèse chez la levure ont montré que ce complexe se compose de 2 sous-complexes : la "base", qui contient 6 ATPases (Rpt1 à Rpt6) et 3 sous-unités non-ATPasiques, Rpn1, Rpn2 et Rpn10, et le "couvercle" qui contient 9 sous-unités, toutes non ATPasiques (Rpn3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 et Rpn15) (Fig.25) (Sharon *et al.*, 2006). Une autre sous-unité, Rpn13, est considérée comme une sous-unité intrinsèque du 19S, jouant un rôle important dans la reconnaissance des substrats ubiquitylés, mais son appartenance à la base ou au couvercle n'a pas encore été déterminée (Zwickl *et al.*, 1999). Enfin, une sous-unité additionnelle, la sous-unité S5b, qui interagit *in vitro* avec les sous-unités Rpn1/S2, Rpt2/S4 et Rpt1/S7, est présente dans le complexe de mammifère.

Reconnaissance des substrats

La majorité des substrats du protéasome sont étiquetés par une chaîne de poly-ubiquitine, qui joue probablement un rôle important dans la reconnaissance des substrats par le protéasome (Fig.26a). La sous-unité Rpn10 de la base du 19S est capable d'interagir avec les chaînes d'ubiquitine impliquant les lysines K48 et K63 de l'ubiquitine, avec la même affinité. L'affinité est augmentée lorsque la taille de la chaîne d'ubiquitine augmente, avec un minimum de 4 molécules d'ubiquitine, ce qui peut s'expliquer par l'organisation des chaînes de poly-ubiquitine en modules de tétra-ubiquitine qui pourraient servir d'unités de reconnaissance par le protéasome. Néanmoins, si la spécificité de Rpn10 pour les chaînes longues de préférence est similaire à celle du 19S, en absence de Rpn10, le protéasome est toujours capable de lier les conjugués d'ubiquitine, ce qui est en accord avec l'existence de récepteurs d'ubiquitine additionnels intrinsèques au protéasome. D'ailleurs, il semblerait qu'une ATPase, la sous-unité Rpt5, soit capable de lier la chaîne d'ubiquitine, même si le motif d'interaction de Rpt5 avec l'ubiquitine reste à identifier. Dans ce cas, vu son appartenance à la base, Rpt5 ne fonctionnerait pas en parallèle de Rpn10 ou d'autres récepteurs de l'ubiquitine, mais plutôt en aval. En outre, la sous-unité Rpn13 du 19S a également été caractérisée comme un récepteur à l'ubiquitine.

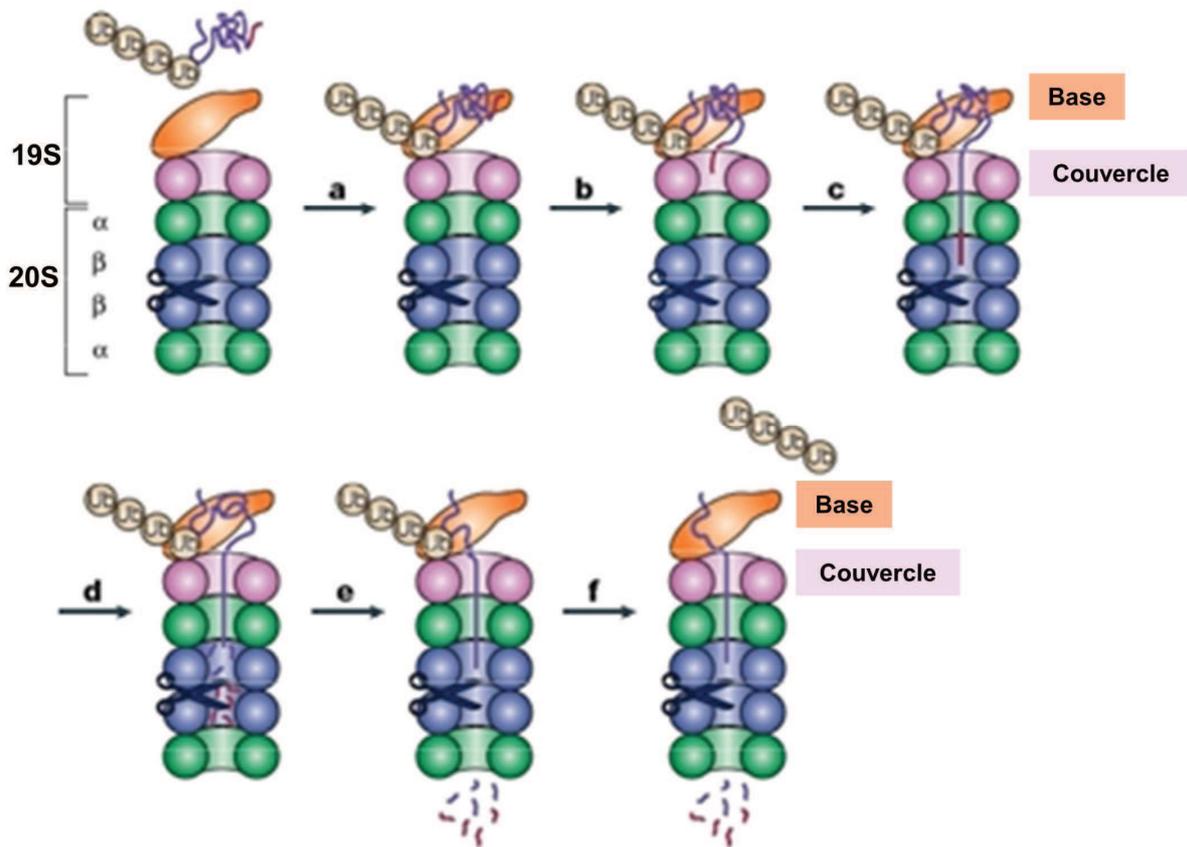


Figure 26 : Etapes de la dégradation des substrats ubiquitylés par le protéasome 26S.

L'association 19S-20S permet d'ouvrir le pore axial du protéasome 20S. Le complexe régulateur 19S, associé à des protéines accessoires du protéasome (non représentées) assure la reconnaissance du substrat lié à une chaîne de poly-ubiquitine (a). Le 19S permet alors le dépliage du substrat (b) et sa translocation (c) vers la chambre protéolytique du 20S (d) où il est hydrolysé en petits peptides (e). Le substrat est déubiquitylé au cours du processus de dégradation avant l'entrée dans la chambre catalytique.

D'après (*Pickart & Cohen, 2004*).

Par ailleurs, certaines sous-unités doivent être capable d'interagir avec des substrats indépendamment de l'ubiquitine puisque la dégradation de certains substrats du protéasome ne nécessitent pas leur ubiquitylation préalable, comme c'est le cas pour ODC, p21 ou encore c-fos (Bossis *et al.*, 2003). La base pourrait servir de plateforme d'interaction avec les substrats du protéasome et permettrait leur positionnement adéquat pour les étapes suivantes de dénaturation et de translocation. En effet, des études sur les protéasomes eucaryotes ont montré que la base peut interagir avec des substrats non-ubiquitylés dénaturés et le complexe archaebactérien PAN interagit avec des protéines natives/repliées et est capable de les dénaturer (Deveraux *et al.*, 1994, van Nocker *et al.*, 1996, Pickart *et al.*, 2004, Schreiner *et al.*, 2008, Peth *et al.*, 2010, Sakata *et al.*, 2012).

En conclusion, le protéasome 26S peut reconnaître ses substrats à la fois via des récepteurs intrinsèques (Rpn10, Rpn13 et Rpt5) mais aussi des récepteurs extrinsèques qui s'associent de façon réversible et transitoire avec le protéasome, et il n'est pas impossible qu'un substrat soit reconnu de manière coordonnée par plusieurs récepteurs.

Dénaturation des substrats

Les substrats doivent être dénaturés pour être transférés à l'intérieur du 20S (Fig.26b et c), car, même une fois ouvert, le canal du 20S est encore trop étroit pour laisser entrer des protéines sous leur forme native (Pickart *et al.*, 2004). Outre le besoin d'ATP pour l'association du 19S et du 20S, la protéolyse des protéines par le protéasome nécessite l'hydrolyse d'ATP. Par homologie avec les protéines chaperonnes, on peut penser que cette énergie permet des cycles de haute et de basse affinité du 19S pour les substrats, permettant ainsi de les maintenir dans une conformation dénaturée pour qu'ils puissent être transférés à l'intérieur du 20S. Ces fonctions (dépliage et translocation des substrats) sont probablement assurées par la base, du fait de sa localisation et de la présence des 6 ATPases à son niveau. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le 20S associé à la base est aussi efficace que le 26S pour la dégradation des substrats non-ubiquitylés et par homologie avec le complexe PAN qui est capable de dénaturer des substrats non ubiquitylés et de les transloquer dans le 20S de manière ATP-dépendante (Smith *et al.*, 2005).

D'autre part, des études faites *in vitro* montrent que la base du protéasome eucaryote peut lier des protéines dénaturées et les relarguer de manière ATP-dépendante, mais peut aussi les renaturer, ce qui dénote des propriétés chaperonnes, et laisse présager de leur capacité à dénaturer les protéines natives. Toutefois, malgré les activités chaperonne-like intrinsèques du protéasome, de nombreux résultats montrent que des protéines chaperonnes agissent de

concert avec le protéasome pour son bon fonctionnement, comme c'est le cas pour la protéine Hsp90 qui est souvent co-purifiée avec le protéasome (Eleuteri *et al.*, 2002). Ces chaperonnes peuvent promouvoir l'ubiquitylation de substrats mal repliés et aider à l'adressage et à la présentation des substrats au protéasome.

Déubiquitylation des substrats

Une fois reconnu par le protéasome 26S, le substrat poly-ubiquitylé est déplié et transloqué au travers du canal du 20S vers la cavité protéolytique. De façon concomitante, le substrat est déubiquitylé (Fig.26f) (Voges *et al.*, 1999, Thrower *et al.*, 2000, Demartino *et al.*, 2007, Koulich *et al.*, 2008). Comme évoqué précédemment, la déubiquitylation des substrats au niveau du protéasome est importante pour plusieurs raisons, non seulement pour le recyclage de l'ubiquitine, mais également du point de vue du fonctionnement du protéasome. De fait, la chaîne formée de 4 ubiquitines qui constitue, dans la majorité des cas, le signal minimal de dégradation, a un diamètre d'environ 28 Å, alors que le diamètre du pore axial du protéasome 20S n'excède pas 20 Å : sans la déubiquitylation, cette chaîne bloquerait la translocation du substrat à l'intérieur du 20S. De plus, les chaînes libres d'ubiquitine doivent être éliminées : sans cela, elles pourraient inhiber le protéasome 26S en entrant en compétition avec les substrats ubiquitylés. Ainsi, la déubiquitylation doit être étroitement couplée à la dégradation et plusieurs activités de déubiquitylation ont été identifiées comme associées au protéasome (Voges *et al.*, 1999, Thrower *et al.*, 2000).

Ouverture du pore

La délétion de la queue N-terminale de la sous-unité $\alpha 3$ décrite précédemment, si elle active fortement le protéasome 20S, n'a pas d'effet notable sur le 26S, ce qui suggère que le 19S joue bien un rôle dans l'ouverture du 20S (Kimura *et al.*, 2003). Cet effet a été imparti aux ATPases du 19S, Rpt2 et Rpt5, via leur motif conservé HbYX (pour Hydrophobic-Tyrosine-X) au niveau de leurs extrémités C-terminales, qui permet l'ouverture du canal du 20S *via* un mécanisme différent que celui opéré par le régulateur 11S (Smith *et al.*, 2007).

Autres rôles du 19S et/ou du 26S

Un autre rôle intéressant du protéasome est son activité de "processing". En effet, dans certains cas, le protéasome ne dégrade pas entièrement le substrat, mais permet la production d'une forme tronquée du précurseur. Cette activité est un mécanisme de régulation qui permet

de faire passer une protéine d'une forme à une autre, et modifier ainsi ses activités cellulaires (Liu *et al.*, 2005b).

Par ailleurs, d'autres fonctions non protéolytiques de type chaperon ou d'ancrage qui pourraient participer aux régulations de l'organisation de la chromatine ou au recrutement de facteurs de transcription ont été attribuées au protéasome 26S et plus particulièrement aux sous-unités ATPases du complexe régulateur 19S (Liu *et al.*, 2005b).

F.3.2. Le protéasome classique des Trypanosomatidés

Chez les Trypanosomatidés, le protéasome a été purifié et caractérisé pour la première fois chez *T. brucei* (Hua *et al.*, 1996). Chez *Leishmania*, le protéasome a été uniquement étudié chez *L. mexicana* (Robertson, 1999). Il a été également retrouvé chez *L. donovani* (Christensen *et al.*, 2000) et *L. major* (Bouzat *et al.*, 2000). Il est décrit dans la littérature comme étant un homologue du protéasome eucaryote (Paugam *et al.*, 2003). Robertson a découvert, chez *L. mexicana*, un protéasome (20S) en forme de baril, d'une masse molaire de 670 kDa (contre 700 kDa chez les Eucaryotes), constitué de 10 sous-unités distinctes de 22 à 32 kDa et qui présente deux activités : l'une de type trypsine et l'autre de type chymotrypsine (Paugam *et al.*, 2003). En présence d'ATP, la forme 26S à 1200 kDa apparaît. Le protéasome 20S de *T. brucei* présente les mêmes caractéristiques que celui de *L. mexicana*, à la différence de leur masse moléculaire (630 kDa). Un activateur du protéasome 20S a également été découvert chez ce parasite. Il s'agit d'une petite protéine de 26 kDa appelé PA26 qui polymérise spontanément avec le protéasome 20S (To *et al.*, 1997). Cette protéine occuperait la même fonction que PA28 chez les Eucaryotes.

Plus récemment, un protéasome 26S a été mis en évidence chez *T. brucei* (Li *et al.*, 2002). Cependant, ce dernier présente quelques différences fonctionnelles avec celui des mammifères (Paugam *et al.*, 2003). De plus, la présence du gène de l'ubiquitine chez *T. brucei* suggère l'existence d'un mécanisme similaire au modèle ubiquitine-protéasome des mammifères.

Plus récemment, l'identification des inhibiteurs du protéasome (comme la lactacystine ou la gliotoxine) a permis de mieux comprendre le rôle du protéasome chez certains parasites. Il est notamment impliqué dans la différenciation cellulaire chez *T. brucei* (Mutomba *et al.*, 1998), dans la réplication chez *L. mexicana* (Robertson, 1999) et dans la survie des amastigotes de *L. chagasi* dans les cellules hôtes (Silva-Jardim *et al.*, 2004). Chez *T. cruzi*, le protéasome semble intervenir dans la différenciation des trypomastigotes en amastigotes.

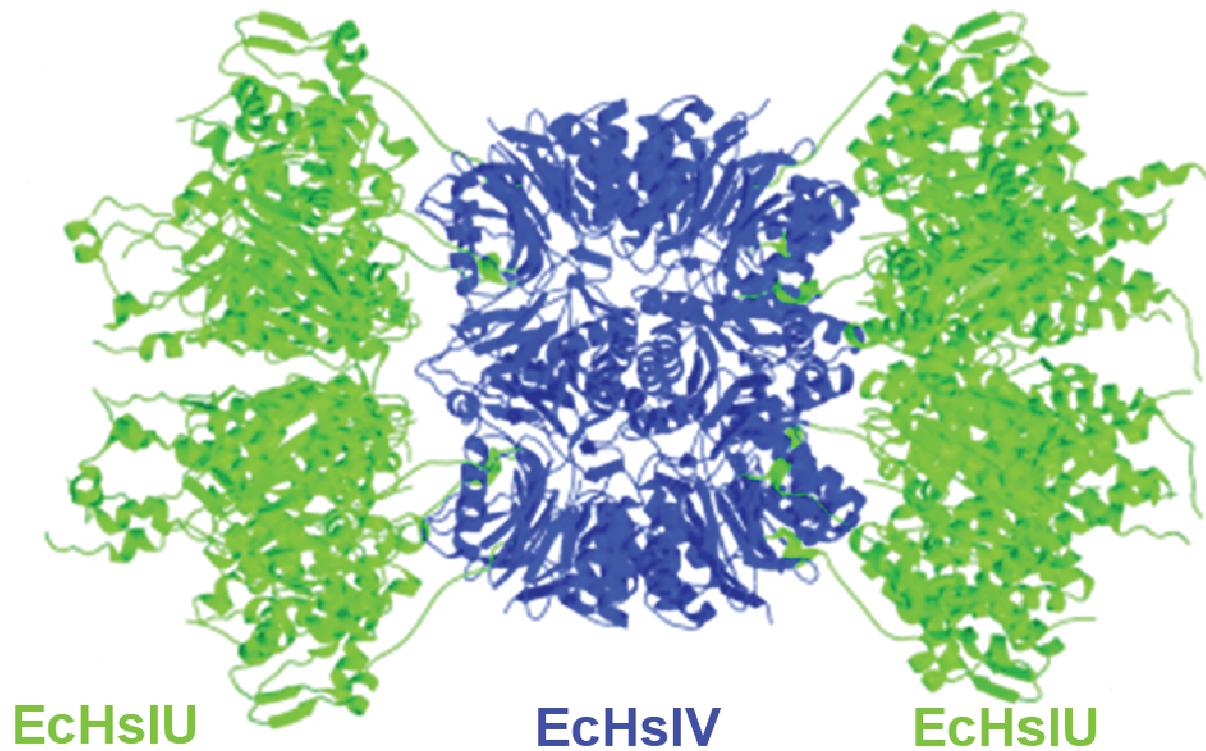


Figure 27 : Structure du complexe HslVU chez *E. coli*.

Structure cristalline du complexe HslVU sous la forme physiologiquement pertinente, établie en fonction des coordonnées du fichier PDB 1G3I (*selon Sousa et al, 2000*). Notez l'insertion des extrémités C terminales de HslU dans les fentes de HslV.

(Adapté de (Groll *et al.*, 2005))

F.4. Le complexe HslVU

Chez les Eubactéries, comme cela a été mentionné plus haut, il existe un complexe similaire au protéasome 20S appelé HslVU, composé d'une protéase, HslV, et d'une ATPase, HslU (Rohrwild *et al.*, 1996) (Yoo *et al.*, 1996b). Ce complexe est produit lors d'un stress. A l'image du protéasome, il intervient dans la dégradation des protéines anormales ou malformées. Il a été décrit chez les Procaryotes, mais a récemment été découvert chez certains Eucaryotes notamment *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Plasmodium* (Couvreur *et al.*, 2002, Gille *et al.*, 2003) et dans de nombreux autres lignages eucaryotes différents (Ruiz-Gonzalez *et al.*, 2006).

F.4.1. Le complexe HslVU chez *E. coli*

Le séquençage complet du génome d'*E. coli* a permis d'identifier 26 nouveaux gènes codant des protéines de choc thermique regroupés sous le terme *hsl* (Chuang *et al.*, 1993a). L'opéron *hslVU* fait partie de ces gènes. Il a été également retrouvé chez d'autres procaryotes dont *Haemophilus influenzae* et *Bartonella henselae*, avec une homologie de 80 % et 60 % (Couvreur *et al.*, 2002). HslV et HslU ont été ensuite purifiées et caractérisées (Yoo *et al.*, 1996b) ; leur structure a été établie (Bochtler *et al.*, 2000, Sousa *et al.*, 2000) et une étude biochimique a été réalisée (Rohrwild *et al.*, 1996, Yoo *et al.*, 1997a, Seong *et al.*, 1999).

HslV et HslU forment un complexe protéasique ATP-dépendant appelé HslVU (ou ClpQY) (Yoo *et al.*, 1997a), composé d'une sous-unité HslV fixée à deux sous-unités HslU (Azim *et al.*, 2005). Il a été décrit comme étant un hybride de la protéase Clp et du protéasome eucaryote. Comme la plupart des protéases chez *E. coli*, HslU et HslV sont des protéines de choc thermique, produites en abondance lors d'un stress. Comme le protéasome 26S, le complexe HslVU dégrade uniquement les protéines spécifiquement reconnues anormales ou malformées et les peptides hydrophiles qui s'accumulent dans la cellule (Missiakas *et al.*, 1996). Cette dégradation a lieu généralement en présence d'ATP (Huang *et al.*, 1997, Seol *et al.*, 1997). Dans la littérature, les auteurs décrivent en particulier son rôle dans la dégradation de SulA, un inhibiteur de la division cellulaire (Kanemori *et al.*, 1999, Seong *et al.*, 1999, Kwon *et al.*, 2004), et de la chaîne β de l'insuline (Yoo *et al.*, 1997a) (Cf. Fig.27).

F.4.1.1. La structure de HslV

Des études de microscopie électronique ont permis d'établir la structure de HslV (Bochtler *et al.*, 1997). Elles montrent une particule cylindrique de 100 Å de diamètre et 75 Å de hauteur. En réalité, HslV est constitué de deux anneaux de six sous-unités d'un seul type, codées par le gène *hslV* (Bochtler *et al.*, 1997). Les séquences de ces sous-unités présentent 20% d'homologie avec les séquences des sous-unités β du protéasome eucaryote (Chuang *et al.*, 1993a), ce qui confirme l'hypothèse qu'HslV pourrait être un protéasome ancestral. HslV est une petite protéase de 19 kDa. Son site catalytique, constitué par un résidu thréonine en N-terminal (comme celui du protéasome 20S), est localisé à l'intérieur de la cavité du complexe. L'activité protéasique d'HslV seul est faible pour les petits peptides et complètement négligeable pour les gros polypeptides (Seol *et al.*, 1997, Yoo *et al.*, 1997a). Cependant, cette activité est multipliée par 200 en présence d'HslU.

F.4.1.2. La structure de HslU

Comme le régulateur 19S, HslU appartient à la superfamille des AAA-ATPases. Cette protéine stimule l'activité protéolytique d'HslV. En absence de HslV, HslU joue le rôle de protéine chaperonne qui empêche l'accumulation de Sula dans la cellule (Seong *et al.*, 2000). En présence d'ATP, HslU forme un anneau de six sous-unités identiques de 50 kDa mais, en absence d'ATP, on la retrouve uniquement sous forme dimérique, montrant clairement que l'ATP est indispensable à l'oligomérisation (Rohrwild *et al.*, 1996). La partie C-terminale d'HslU constitue la zone d'interaction avec HslV (Ramachandran *et al.*, 2002). Cette interaction fait intervenir 10 résidus qui sembleraient être très conservés chez les micro-organismes. Ils jouent un rôle essentiel non seulement dans la formation du complexe HslVU mais également dans l'activation de la peptidase HslV. En effet, un peptide synthétique correspondant aux 10 résidus de l'extrémité C-terminale de HslU est capable, en absence d'ATP, d'activer HslV (Seong *et al.*, 2002).

Lors de l'association du complexe, les deux pores centraux de HslU et HslV s'alignent pour former la chambre catalytique à l'image du protéasome 26S. Cependant, sa dimension est si petite qu'un seul polypeptide peut être traité à la fois. Le site catalytique est accessible uniquement pour les protéines substrats qui ont été au préalable déroulées. HslU porte un motif GYVG qui intervient justement dans le déroulement et la translocation de ces protéines substrats (Park *et al.*, 2005), ce processus étant ATP-dépendant (Seong *et al.*, 2002).

F.4.2. L'homologue de HslVU chez les Trypanosomatidés

C'est en micro-séquençant des protéines potentiellement antigéniques que Couvreur et collaborateurs ont décrit pour la première fois la présence d'HslV de type procaryote chez *Leishmania* (Couvreur *et al.*, 2002). Par RT-PCR, ils ont confirmé la présence de l'ARNm correspondant. La recherche dans les banques de données leur a permis de retrouver tous les gènes codant pour les protéines du complexe HslVU chez *Leishmania* et également chez *T. brucei* et *T. cruzi*. La séquence de ces protéines présente 60 % d'homologie avec celles d'*E. coli*. Les logiciels TargetP ou SignalP indiquent une forte probabilité pour une localisation mitochondriale de ces protéines.

A partir de ces observations, quelques équipes ont essayé de déterminer le rôle de HslVU chez les Trypanosomatidés (Li *et al.*, 2008, Barboza *et al.*, 2012, Chrobak *et al.*, 2012), mais également chez *Plasmodium* (Ramasamy *et al.*, 2007, Tschan *et al.*, 2010). En effet, des études récentes ont non seulement montré l'existence du complexe chez les Trypanosomatidés, mais également dans plusieurs lignages eucaryotes différents (Gille *et al.*, 2003, Ruiz-Gonzalez *et al.*, 2006).

En 2008, Li et son équipe caractérisent pour la première fois chez un trypanosomatidé (*T. brucei*) l'homologue du complexe HslVU ; ils déterminent sa localisation dans la mitochondrie de *T. brucei* et son rôle dans la réplication de l'ADN mitochondrial. Leurs travaux indiquent que TbHslVU a une activité peptidase ATP-dépendante et, comme son homologue bactérien, a une lysine et des thréonines N-terminales essentielles dans sa sous-unité catalytique. Par marquage épitopique, ils ont localisé les trois sous-unités de TbHslVU dans la mitochondrie de *T. brucei*, ils ont aussi montré que ce complexe était associé au génome mitochondrial, l'ADN du kinétoplaste (kDNA). Pour évaluer la fonction de TbHslVU, ils ont utilisé l'ARNi pour inhiber l'expression de chacune des trois sous-unités dans les trypanosomes procycliques. L'inhibition des transcrits indépendamment, confirmée par Northern blot, a entraîné une inhibition modeste à forte de la croissance cellulaire. L'ARNi de TbHslV a entraîné l'effet inhibiteur le plus élevé, l'ARNi simultané de TbHslU1 et TbHslU2 a conduit à un défaut de croissance plus important que celui des ARNi individuels de chacune de ces sous-unités (qui n'entraînent presque pas de défaut de croissance, suggérant une redondance des sous-unités TbHslU1 et TbHslU2), mais restant toujours moins élevé que ce qu'on observe après l'ARNi de TbHslV. Plus important, ils ont découvert que la fonction de TbHslVU était de contrôler la réplication / ségrégation du kDNA. En effet, leurs résultats montrent que l'ARNi de TbHslVU affecte considérablement

le kDNA en provoquant une sur-réplication de l'ADN des minicercles, conduisant à des défauts de ségrégation du kDNA et, par la suite, à une croissance continue du réseau de kDNA jusqu'à une taille énorme. Ces résultats démontrent que TbHslVU est une protéase bactérienne identifiée dans les mitochondries d'un Eucaryote et que ce complexe a une nouvelle fonction dans la régulation de la réplication de l'ADN mitochondrial qui n'a jamais été observée dans d'autres organismes.

En 2009, une autre étude vient compléter ces premières données concernant le rôle de HslVU chez *T. brucei*. Liu et son équipe démontrent en effet que TbPIF2, une des six hélicases mitochondriales des trypanosomes, est essentielle pour la réplication des maxicercles. Leurs travaux montrent que l'abondance des maxicercles est contrôlée par le niveau cellulaire de TbPIF2. En effet l'ARNi de cette hélicase entraîne la perte des maxicercles tandis que sa surexpression provoque une augmentation de 3 à 6 fois de l'abondance des maxicercles. Par ailleurs, la surexpression de TbPIF2 dans des lignées d'ARNi de TbHslV et TbHslU1+U2 entraîne une accumulation de TbPIF2 dans ces lignées cellulaires, ce qui permet aux auteurs de démontrer que la régulation de la quantité des maxicercles par TbPIF2 est médiée par la protéase HslVU chez *T. brucei*. Par conséquent pour les auteurs, cette hélicase est un substrat de TbHslVU et constitue le premier exemple d'un régulateur positif, fournissant ainsi un mécanisme moléculaire pour contrôler la réplication des maxicercles.

En 2012, l'étude du complexe HslVU chez *L. donovani* rapporte des résultats assez divergents de ceux présentés chez *T. brucei*. Tout d'abord concernant la localisation subcellulaire du complexe, Chrobak et son équipe montrent, par immunofluorescence indirecte et par microscopie à fluorescence des protéines de fusion eGFP, une distribution subcellulaire distincte pour chacune des trois sous-unités du complexe HslVU, arguant contre une association entre HslV et les deux protéines HslU chez *L. donovani*. HslV forme des points d'accumulation, en partie le long de la membrane plasmique et en partie dans le cytoplasme. La localisation de HslU1 est proche ou dans les compartiments contenant l'ADN (noyau et kinétoplaste), tandis que HslU2 se trouve principalement près de l'extrémité antérieure de la cellule. Afin d'en apprendre davantage sur le rôle de LdHsV, les auteurs ont effectué des expériences de remplacement de gènes en ciblant les trois sous-unités du complexe par recombinaison homologue. Ils ont obtenu des résultats variables pour chacun des trois gènes. Le remplacement des deux allèles de HslU2 a donné des promastigotes viables, en prolifération. Le seul phénotype qu'ils pouvaient associer au mutant nul ($HslU2^{-/-}$) était un taux de croissance réduit. Ce phénotype étant atténué par l'ajout d'un transgène *HslU2*, ce qui

démontre que le défaut de croissance était bien du à l'absence de HslU2. L'infectivité d'une lignée cellulaire de type macrophage n'a pas semblé être affecté dans le mutant nul. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus pour HslV. Aucun mutant nul pour ce gène n'a pu être obtenu chez *L. donovani*, malgré des tentatives répétées. En revanche, le gène codant pour HslV n'a pu seulement être remplacé qu'en présence d'un transgène supplémentaire *HsIV* : les auteurs ont donc conclu que HslV était essentielle pour la viabilité et / ou la croissance des promastigotes. Les tentatives des auteurs pour créer des mutants nuls HslU1 ont toutes échoué, même en présence de transgènes. Sans pouvoir exclure totalement une absence de recombinaison pour expliquer ces échecs de remplacement de gènes, les auteurs ont émis l'hypothèse d'un rôle vital de HslU1. Enfin, les auteurs montrent que HslV et les protéines HslU ne forment pas d'hétéro-oligomères. Au contraire, LdHslV s'assemble spontanément en un homo-dodécamère tandis que LdHslU2 fait partie d'un complexe de protéines beaucoup plus grand. Aucune configuration native définie n'ayant pu être observée pour HslU1. Ce qui va encore dans le sens d'une absence d'interaction entre ces trois sous-unités.

Pour terminer, concernant le complexe HslVU chez *T. cruzi*, Barboza et son équipe ont étudié la localisation de TcHslV par immunolocalisation, ils ont constaté que TcHslV est principalement localisée dans le kinétoplaste avec une distribution dans le cytoplasme. Pour confirmer ces résultats ils ont effectué un test ultrastructural par immunocytochimie et les résultats ont montré un seul endroit dans le kinétoplaste. Les auteurs ont par ailleurs exprimé et obtenu des anticorps spécifiques des protéines recombinantes HslU (qui s'est révélé être HslU1 d'après le nom du gène donné par les auteurs dans leurs matériels et méthodes) et HslV et ont démontré l'interaction entre HslU et HslV par co-immunoprécipitation. Pour les auteurs, l'ensemble des résultats obtenus dans cette étude suggère la coexistence de la protéase et HslVU et du protéasome 20S chez *T. cruzi*, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle les voies de dégradation non lysosomales ont un rôle important dans la biologie de *T. cruzi*.

Les résultats rapportés par ces équipes, y compris la nôtre, sur la localisation et/ou la fonction des trois protéines du complexe HslVU chez les protistes sont plus ou moins divergents et **feront l'objet du premier chapitre de cette thèse.**

CHAPITRE 1

**Etude du protéasome d'origine
bactérienne "HslVU" chez les
Trypanosomatidés.**

*"Le commencement de toutes les sciences, c'est l'étonnement de ce
que les choses sont ce qu'elles sont"*

-Aristote-
("La métaphysique")

A. Présentation de l'article 1 : Le complexe HslVU chez les Trypanosomatidés

Leishmania et *Trypanosoma* possèdent, en plus du protéasome "classique" eucaryote, le complexe HslVU, précédemment décrit chez les bactéries, qui s'apparente au protéasome "classique" par son mode de clivage et sa structure générale (Gottesman, 2003). Des travaux antérieurs (Li *et al.*, 2008) ont montré que les trois sous-unités du complexe HslVU étaient localisées dans la mitochondrie de *T. brucei*. De plus, par ARN interférence, les mêmes auteurs ont montré que l'inhibition de HslV, comme celle de HslU1 et HslU2 simultanément, entraînaient un arrêt de la croissance des parasites résultant d'une sur-réplication de l'ADN du kinétoplaste ainsi que des défauts de ségrégation de celui-ci. D'autres travaux (Chrobak *et al.*, 2012), portant sur *L. donovani*, ont au contraire rapporté une absence de localisation mitochondriale des trois sous-unités du complexe et concluent à une absence d'interaction stable des trois partenaires du complexes qui, selon ces travaux, auraient chacun un localisation différente au sein des cellules parasitaires.

Les objectifs de ce travail étaient : (i) de déterminer la localisation subcellulaire des trois partenaires du complexe HslVU chez *L. major*, et pour la première fois dans les formes sanguines de *T. brucei* et (ii) de déterminer l'importance de chacune de ces sous-unités chez ces parasites. Ces études ont été réalisées par ARN interférence, à la fois dans les formes procycliques et dans les formes sanguines de *T. brucei*, mais aussi par des expériences de complémentation dans les formes procycliques de *T. brucei*.

B. Publication (article soumis)

The Bacterial-like HslVU Protease Complex is Involved in the Control of Different Cell Cycle Events in Trypanosomatid Parasites

Authors: Diane-Ethna Mbang^{1,2}, Yvon Sterkers^{1,2,3}, Ndeye-Mathy Kebe⁴, Lucien Crobu², Olivier Coux⁴, Jean-François Hernandez⁵, Sabrina Meghamla^{1,2}, Michel Pagès^{1,2} and Patrick Bastien^{1,2,3,6}

CHAPITRE 2

**Exploration fonctionnelle de
protéines mitochondriales par ARN
interférence semi-systématique chez
T. brucei.**

*"Si j'avais su je n'aurais jamais fait, si je n'avais pas fait je
n'aurais jamais su"*

-Robert Half-

A. Présentation de l'article 2 : Importante diversité de protéines mitochondriales impliquées dans le cycle cellulaire de *T. brucei*.

Trypanosoma brucei, protozoaire parasite responsable de la Trypanosomiase Humaine Africaine, possède une mitochondrie unique qui intervient, entre autres, dans le métabolisme énergétique du parasite (Panigrahi *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2010) et dans le bon déroulement de son processus de division cellulaire (Ploubidou *et al.*, 1999). Par ailleurs, son cycle cellulaire est complexe et encore assez mal compris au niveau moléculaire. Le génome de *T. brucei* contient environ 8000 gènes codant pour des protéines avec plus de la moitié n'ayant pas de fonction prédite (<http://www.genedb.org>).

Dans ce contexte, des approches de crible par ARN interférence ont été utilisées pour déterminer le rôle de ces protéines encore non annotées, à l'exemple du criblage des gènes du chromosome I (Subramaniam *et al.*, 2006) afin d'identifier les gènes essentiels du chromosome I dans les formes sanguines de *T. brucei* ou encore de celui d'une banque de RNAi effectuée dans les formes procycliques de *T. brucei* afin d'identifier de nouveaux régulateurs essentiels du cycle cellulaire chez cet organisme (Monnerat *et al.*, 2009).

Dans cette étude, nous avons effectué un criblage par ARN interférence sur 101 gènes codant pour des protéines mitochondriales dans les formes procycliques de *T. brucei*, afin d'identifier celles qui seraient impliquées, directement ou indirectement, dans le bon déroulement du "cycle cellulaire mitochondrial" évoqué dans l'Introduction.

B. Publication (manuscrit en préparation)

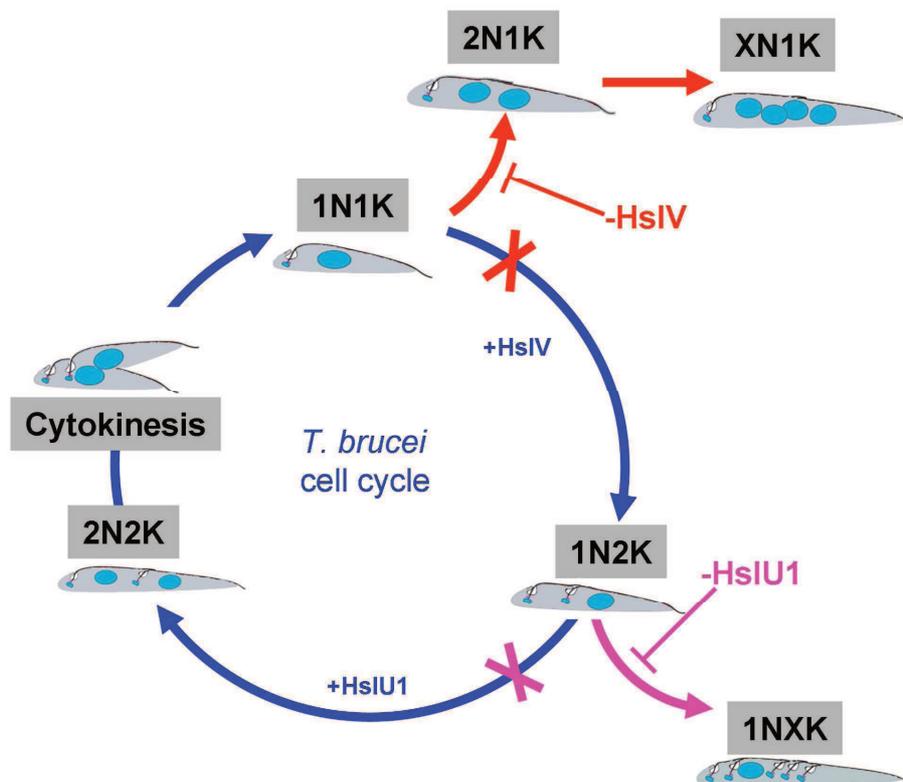
A large proportion of mitochondrial proteins is involved in the cell cycle progress in *Trypanosoma brucei*

Authors : Diane-Ethna Mbang^{1,2}, Yvon Sterkers^{1,2,3}, Lucien Crobu², Michel Pagès^{1,2}
and Patrick Bastien^{1,2,3,4}

CONCLUSION DES

CHAPITRES 1 ET 2

Mettant un terme à plusieurs publications contradictoires, ce travail permet de confirmer la localisation mitochondriale du complexe HslVU chez *L.major* et *T. brucei*. Nous montrons aussi pour la première fois que HslVU est à la fois essentiel dans les formes sanguines, celles présentes chez l'hôte mammifère, et dans les formes procycliques. En plus de ce caractère essentiel du complexe chez ces Trypanosomatidés, nous mettons en évidence un rôle différencié de deux de ses sous unités dans le déroulement du cycle cellulaire associé au kinétoplaste et proposons le modèle ci-dessous d'implication des sous unités HslV et HslU1 dans le cycle cellulaire de *T. brucei*. Ainsi, HslVU apparaît comme la cible thérapeutique la plus prometteuse contre les leishmanioses et la trypanosomiase.



Modélisation schématique du rôle du complexe HslVU dans le cycle cellulaire de *T. brucei* (Figure 5 de l'article 1).

Le deuxième objectif de cette thèse a été d'identifier de nouvelles protéines mitochondriales régulatrices du cycle cellulaire associé au kinétoplaste. Même si cet objectif n'a pas été atteint, ce travail nécessite en effet des expériences supplémentaires pour pouvoir véritablement attribuer une implication d'une protéine dans le cycle cellulaire, nous avons néanmoins ouvert de nombreuses pistes pour des recherches complémentaires. En effet, si

l'inhibition de l'expression de la majorité des protéines étudiées (62/101) n'a conduit à aucun effet sur la croissance cellulaire, l'inhibition de l'expression des 39 restantes a entraîné une modification significative et avec plus ou moins d'ampleur du déroulement du cycle cellulaire qui apparaît ainsi être largement dépendant de l'ensemble des activités cellulaires.

DISCUSSION

"L'imprévisible est dans la nature même de l'entreprise scientifique. Si ce qu'on va trouver est vraiment nouveau, alors c'est par définition quelque chose d'inconnu à l'avance"

-François Jacob-
("Le jeu des possibles")

Depuis la mise en évidence du complexe HslVU chez les protozoaires parasites responsables des principales parasitoses humaines (Couvreux *et al.*, 2002, Gille *et al.*, 2003), plusieurs équipes ont tenté d'explorer son rôle dans la biologie de ces organismes. L'un des enjeux correspondants était de valider et étudier ce complexe comme cible thérapeutique potentielle, étant donné son absence chez l'hôte mammifère. Le premier problème posé, outre la localisation intracellulaire du complexe, concernait la définition de son rôle et le caractère essentiel de ses fonctions. A cette première étape, les avis divergent au sujet de la localisation, et, bien que le caractère essentiel de HslV ait fait l'unanimité, des données contradictoires ont été publiées concernant l'autre partenaire protéique du complexe : HslU.

A l'image du complexe bactérien HslVU, pour lequel on dispose de nombreuses données structurales et fonctionnelles (Rohrwild *et al.*, 1997, Seong *et al.*, 1999, Sousa *et al.*, 2000) un second point a été d'identifier le rôle respectif des deux principales sous-unités HslV et HslU, organisées en double hexamère. Chez les Eubactéries, la protéine HslV, qui constitue le corps central du complexe, assure l'activité de protéolyse, la protéine HslU ayant elle une double fonction (i) de reconnaissance des substrats liée à une activité ATPasique (Rohrwild *et al.*, 1996) (ii) d'activation du complexe protéolytique HslV via son extrémité C-terminale (Seong *et al.*, 2002). Rappelons que le problème de la reconnaissance des substrats par HslU n'est que très partiellement compris car, si on connaît le domaine d'interaction avec le substrat dans la séquence de HslU (reviewed in (Hsieh *et al.*, 2011)), il n'est pas clairement établi que cette reconnaissance soit possible ou non si le substrat est modifié post-traductionnellement à l'image des substrats des protéasomes 20S et 26S.

Chez les Trypanosomatidés s'ajoutaient plusieurs questions du fait de la présence de deux sous-unités HslU1 et HslU2. Celles-ci avaient-elles une activité de reconnaissance des substrats identique ou au contraire spécifique à chacune d'elles ? En deuxième lieu, l'activité du complexe reposait-elle sur un complexe "hétérogène" HslU1 associé à HslU2, ou strictement "homogène" donnant lieu en conséquence à deux complexes différenciés HslVU1 et HslVU2 ? A la lumière des différents résultats publiés, nous discuterons ces différentes questions dans la première partie de cette Discussion.

Localisation intracellulaire de HslVU

Les travaux de Li et collaborateurs (Li *et al.*, 2008), utilisant des protéines recombinantes fusionnées à l'épitope hémagglutinine (HA) ont montré une localisation exclusivement mitochondriale des trois sous-unités du complexe chez *T. brucei*. Nous avons retrouvé les mêmes résultats chez *L. major* avec des protéines fusionnées à la GFP. Par contre, chez *L.*

donovani, de façon surprenante, (Chrobak *et al.*, 2012) n'ont pas retrouvé cette même localisation pour ces trois protéines

Concernant la localisation de HslV, deux techniques ont été utilisées par ces auteurs : d'une part l'immunofluorescence à l'aide d'anticorps anti-HslV et d'autre part une protéine recombinante de fusion HslV-GFP. Une localisation ponctuée est décrite qui, selon les auteurs, ne correspond pas aux images classiques de la mitochondrie. Cependant, l'examen de leurs propres images ne nous amène pas à la même conclusion. En effet, sans doute en raison d'une trop forte expression de la protéine recombinante, on assiste à une accumulation de celle-ci, et à une très forte saturation de l'image. En réalité, l'examen précis révèle, au-delà de ces très fortes punctuations, un pattern en réseau que nous reconnaissons comme le réseau mitochondrial. Techniquement, le choix pour ces images de la microscopie confocale qui atténue fortement la fluorescence de faible niveau, n'a fait qu'aggraver le résultat. Malheureusement, ces auteurs n'ont pas cru bon d'utiliser un marqueur spécifique de la mitochondrie (MitoTracker). Par ailleurs, de façon aussi surprenante, ces mêmes auteurs ne constatent pas de localisation de HslU1, exprimée sous forme de protéine de fusion à la GFP en C-terminal, dans la mitochondrie, mais plutôt « près du (ou dans le) noyau et kinétoplaste ». En réalité, un examen minutieux de leurs données montre que la séquence recombinante de HslU1-GFP n'inclut pas la séquence d'adressage mitochondrial en N-ter dans la séquence recombinante, ce qui logiquement peut expliquer la localisation obtenue. Nos propres expériences de localisation avec ces trois protéines recombinantes fusionnées à la GFP montrent clairement que ces protéines sont mitochondriales, en accord avec leur colocalisation avec le MitoTracker et les prédictions d'adressage en bio-informatique. Enfin, l'argument selon lequel nos résultats ont été établis sur *L. major* et les leurs sur *L. donovani*, ceci pouvant expliquer la différence entre ces résultats, ne nous paraît pas recevable ni pertinent, tant l'homologie de séquence entre les protéines de ces deux espèces est particulièrement élevée.

Chez *T. cruzi*, (Barboza *et al.*, 2012) ont montré avec des anticorps spécifiques une localisation prédominante de HslV au niveau du kinétoplaste. Les images d'épi-fluorescence révèlent également sa présence dans le corps cellulaire, sans pouvoir confirmer ou infirmer qu'elle soit mitochondriale, en l'absence d'utilisation d'un marqueur spécifique de cet organelle. Par des expériences de co-immunoprécipitation, ces auteurs concluent ensuite à une interaction entre HslU et HslV, ce qui suggère une colocalisation au moins partielle ou temporaire de ces deux protéines bien que l'expérimentation directe de colocalisation n'ait pas été réalisée.

Activité et caractère essentiel de HslV.

L'activité protéolytique de HslV est validée par de nombreuses expériences (Li *et al.*, 2008) chez *T. brucei*, et entre autres, chez *E. coli* (Yoo *et al.*, 1996a, Yoo *et al.*, 1997b, Seong *et al.*, 1999). *In vitro*, le complexe purifié a effectivement une activité catalytique et ce indépendamment de la présence de la protéine activatrice HslU (Seol *et al.*, 1997). On doit noter cependant que cette activité est fortement renforcée par la présence de peptides analogues à l'extrémité C-terminale de la séquence de HslU (Rathore *et al.*, 2011). Par ailleurs, le caractère essentiel de HslV pour la survie de ces parasites est attesté par nos données et ne peut guère faire l'objet de contestation : en effet, il est appuyé par nos résultats (cf. chapitre 1) d'ARN interférence chez *T. brucei*, associés à ceux de Li et coll. (Li *et al.*, 2008), ainsi que par l'impossibilité d'obtenir des mutants viables ne disposant plus de ce gène chez *L. donovani* (Chrobak *et al.*, 2012).

Une question cependant reste en suspens : *in vivo*, HslV peut-elle avoir une activité indépendante de HslU1 et HslU2 ? Expérimentalement, ce point ne peut pas être testé. En effet, comme nous le verrons dans la suite de cette discussion, l'absence de HslU est elle-même un facteur d'inhibition de la croissance. Le seul argument indirect en faveur d'un rôle indépendant du complexe HslV *in vivo* repose sur le fait que l'inhibition de l'activité de HslV conduit à un phénotype différent de celui observé pour l'inhibition de HslU1 ou HslU2 (voir Fig. 4 de l'Article 1). Par ailleurs, si on s'autorise le parallélisme entre HslVU et le protéasome classique 20S/26S, il est aujourd'hui communément admis que le complexe protéolytique 20S peut avoir seul, une activité de dégradation *in vivo* indépendante (Kisselev *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 2003).

Redondance et caractère essentiel de HslU1 et HslU2

Le travail initial de et coll. (Li *et al.*, 2008) aboutissait à des conclusions sans appel : TbHslU1 et TbHslU2 avaient une activité identique et étaient parfaitement redondantes. Ce résultat se déduisait logiquement du fait que l'inhibition indépendante de l'expression de chacune de ces deux protéines par RNAi n'avait aucun effet sur la croissance parasitaire alors que, de leur inhibition concomitante, résultait un arrêt de la croissance. Pour ces auteurs, ce résultat se justifiait par la forte homologie de séquence entre ces deux protéines. Sur ce point, il est important de noter que les domaines de reconnaissance des substrats (domaine I) de ces deux protéines paralogues sont radicalement différents, tant en termes de séquence que dans les reconstructions en 3 dimensions, un point que Li et coll. n'ont pas relevé alors que ces

données apparaissaient dans les figures de leurs *Supplemental Data*. Nos propres résultats sont en désaccord avec les leurs sur ce point, puisque les multiples expériences d'ARN-interférence que nous avons réalisées, en alternant en particulier les séquences cibles, nous ont amené à conclure à un rôle essentiel pour HslU1 et à un rôle mineur pour HslU2. Dans la deuxième partie de cette Discussion, nous reprendrons les hypothèses qui pourraient expliquer une certaine fluctuation des phénotypes observés lors des expériences d'ARN interférence.

Quid de l'interaction HslV-HslU ?

Chez *Leishmania* et *T. cruzi*, on retrouve également les deux protéines HslU1 et HslU2. Chez *L. donovani*, les travaux de Chrobak et coll. (Chrobak *et al.*, 2012) ont là aussi amené une contradiction en montrant l'absence d'interaction entre HslV et les protéines HslU1 et HslU2. Cependant, leur argument tient essentiellement à l'absence de co-localisation entre ces trois protéines, qui leur permet logiquement de conclure à une absence d'interaction. Or, nous avons vu plus haut les failles importantes dans l'expérimentation qui sauraient expliquer cette absence de colocalisation. A l'inverse, comme noté plus haut, Barboza et coll. (Barboza *et al.*, 2012) ont déduit une interaction HslV-HslU1 d'après des expériences de co-immunoprécipitation. Les données sur le complexe HslVU des Eubactéries (Ramachandran *et al.*, 2002, Seong *et al.*, 2002) et de *Plasmodium* (Rathore *et al.*, 2011) ainsi que celles sur celui de *Leishmania* dont nous disposons dans la cadre d'un projet en collaboration (Jean-François Hernandez, Olivier Coux, et coll., non publié) nous autorisent à penser que l'extrémité C-terminale de HslU est bien responsable de l'interaction et de l'activation de HslV chez les Trypanosomatidés.

Participation concomitante ou indépendante de HslU1 et HslU2 à l'activité du complexe HslVU ?

Formellement, nous n'avons aucun argument pour dire que des complexes "hétérogènes" HslVU1-U2 sont présents et actifs *in vivo*. Par contre, nos données montrent que l'inhibition indépendante de l'expression de HslU1 ou HslU2 conduit à des phénotypes de croissance différents (forte inhibition ou inhibition modérée). Logiquement, on peut donc conclure d'une part que les complexes ne sont pas exclusivement "hétérogènes", et d'autre part, puisque des complexes "homogènes" existent, que seule la présence du complexe "homogène" HslVU1 est indispensable à la survie parasitaire. Dans ce contexte expérimental, ce complexe "homogène" existe et il est efficient. La présence de HslU2, en particulier donc d'un complexe "hétérogène", ne paraît ni utile ni nécessaire dans ce même contexte.

Rôle de HslVU dans le cycle cellulaire.

L'inhibition de l'expression par ARNi de HslV et HslU1 modifie le déroulement du cycle cellulaire, même si ces deux *knockdown* ont des effets différents, l'inhibition de HslV entraînant essentiellement l'apparition de cellules multinucléées, tandis que celle de HslU1 perturbe surtout la réplication du kinétoplaste. Par ailleurs, Li et coll. (Li *et al.*, 2008) ont démontré l'importance de HslV dans la réplication et la ségrégation du kinétoplaste, un processus essentiel dans le déroulement de la division cellulaire chez les Trypanosomatidés. De plus, Liu et coll. (Liu *et al.*, 2009) ont mis en évidence, chez des mutants ARNi-HslV, l'accumulation de la protéine TbPIF2, cette protéine étant nécessaire à la réplication de l'ADN mitochondrial. L'hypothèse persiste donc selon laquelle le complexe HslVU aurait un rôle dans la dégradation de protéines impliquées dans différents processus du "cycle cellulaire mitochondrial" évoqué dans l'Introduction générale.

Toutefois, les expériences d'ARN interférence entreprises sur les protéines mitochondriales dans mon travail montrent parallèlement que toute inhibition de croissance moyenne ou sévère s'accompagne également dans tous les cas d'une anomalie du déroulement du cycle cellulaire (objectivée par une répartition anormale des différents stades de ce cycle). Ces effets ne sont pas rares puisqu'observés pour 40% des protéines testées. Comme il semble peu vraisemblable qu'un nombre aussi important de ces protéines entre directement dans la régulation du cycle cellulaire, il est raisonnable de penser qu'un bon nombre d'entre elles ont des fonctions importantes dans différents processus biologiques de la cellule/mitochondrie. En conséquence, si le protéasome HslVU intervient bien dans le déroulement du cycle cellulaire, cette activité pourrait être très indirecte. Par exemple, de nombreuses protéines ont été démontrées comme ayant un effet sur la cytodierèse sans pour autant apparaître comme directement impliquées dans la cytodierèse à proprement parler (review dans (Hammarton *et al.*, 2007)). A l'extrême, il n'est pas possible d'exclure que des mécanismes aussi généraux que le métabolisme énergétique, fortement lié à l'activité mitochondriale, puissent avoir une influence sur le déroulement de ce cycle.

Dans ce domaine, la caractérisation des différents substrats du protéasome HslVU constituerait une étape sans doute décisive. Contrairement au protéasome 26S où les molécules substrats sont modifiées au niveau post-traductionnel, rien n'indique que ceci pourrait être le cas pour HslVU. Au cours de ma thèse, j'ai recherché par la technique du double hybride d'éventuels substrats du protéasome HslVU. Une des pistes était de caractériser des protéines s'associant au domaine d'interaction de HslU. Ces expériences

n'ont pas été concluantes : deux raisons pourraient expliquer cet échec, d'une part le caractère fugace de cette interaction et d'autre part le fait que cette interaction s'établit très préférentiellement avec l'hexamère et non la protéine seule de HslU. Deux approches complémentaires peuvent être envisagées dans ce sens : d'une part une approche au cas par cas, visant à vérifier l'accumulation de chaque protéine candidate fusionnée à la GFP chez des mutants RNAi HslV⁻ ; d'autre part une approche plus globale de protéomique comparant souche sauvage et mutant HslV⁻. Ceci pourrait permettre de définir les multiples niveaux d'intervention de ce protéasome sur les protéines mitochondriales et son rôle dans l'homéostasie cellulaire.

Beaucoup de protéines mitochondriales non essentielles ?

Majoritairement (à 61%), les protéines mitochondriales que nous avons testées s'avèrent sans effet sur la croissance cellulaire lors de leur inhibition, donc non essentielles à la survie du parasite. Plusieurs remarques peuvent justifier ce résultat. En premier lieu, l'activité de ces protéines n'a été testée que dans un seul stade de différenciation, le stade procyclique. Même si l'activité mitochondriale est considérée comme importante à ce stade, ces protéines pourraient n'être actives qu'à un autre stade du cycle parasitaire. Toutefois, les différentes études de transcriptomique réalisées sur ces parasites révèlent plutôt, entre les divers états de différenciation, des variations quantitatives discrètes du transcriptome que des changements qualitatifs drastiques (Jensen *et al.*, 2009, Kabani *et al.*, 2009, Queiroz *et al.*, 2009) : ceci suggère que les régulations sont davantage le fait de modulations autour d'équilibres que de variations du type "tout ou rien".

Une seconde raison peut tenir au caractère redondant du contenu fonctionnel du génome. La plupart des protéines testées n'ont pas de fonction clairement établie ; en conséquence, il est difficile d'établir si d'éventuelles complémentations existent entre elles, ou avec les autres protéines codées par ce génome.

Ces deux remarques faites, nous pensons que les ressources génétiques du génome sont loin de correspondre à de strictes fonctionnalités toujours bien définies. Si, par définition, le génome dans son état présent est adapté à la reproduction et au développement du parasite, il a également permis de faire face à de multiples changements au cours de l'évolution, particulièrement chez les Trypanosomatidés dont l'origine est "ancestrale". En conséquence, l'adaptation des parasites au cours de l'évolution tient non seulement aux mutations/délétions/etc... classiquement invoquées dans ce domaine, mais également à ces potentialités, non exploitées à un temps donné, mais susceptibles d'être utilisées à tout

moment. La vision trop "mécanistique" du génome juste utile à gérer le temps présent, est aujourd'hui en grande partie remise en cause par le développement de l'épigénétique. Source de fluctuations dans l'expression des gènes, l'épigénétique, qui s'appuie sur les "réserves" du génome, constitue aujourd'hui, bien avant les éventuelles mutations, un des premiers mécanismes d'adaptation (Jaenisch *et al.*, 2003, Mifsud *et al.*, 2011).

Rôle des protéines mitochondriales de fonction inconnue

Comme exposé plus haut, l'ARN interférence ciblant les protéines mitochondriales a montré une anomalie du déroulement du cycle cellulaire dès lors qu'une inhibition de croissance moyenne ou sévère était constatée, c'est-à-dire pour 39% des protéines testées. Il ne nous est pas possible à l'heure actuelle de savoir dans quels processus cellulaires ces protéines sont impliquées. Un certain nombre de phénotypes observés laissent à penser que certaines d'entre elles sont impliquées dans la division cellulaire ou dans des processus annexes tels que la réplication/duplication d'organites ou de structures essentiels à cette division (mitochondrie, kinétoplaste...). La complexité extraordinaire de la réplication et de la ségrégation du kinétoplaste, par exemple, fait probablement intervenir des dizaines de protéines, tout comme la cytodierèse proprement dite. Toutefois, nous avons considéré plus haut que d'autres processus biologiques pourraient avoir un effet indirect sur la division cellulaire. Un examen plus précis des phénotypes induits d'une part par ARNi, d'autre part par la surexpression de ces protéines, devra donc être entrepris pour mieux cerner leur fonction éventuelle. Si l'implication dans la division cellulaire de certains candidats est appuyée par cette étude complémentaire, l'étude de leur régulation par le protéasome HslVU pourrait être entreprise comme indiquée ci-dessus.

L'ARN interférence et ses résultats parfois fluctuants ?

Si chacun admet la grande efficacité des techniques d'ARN interférence chez *T. brucei*, un nombre important de résultats contradictoires ont été révélés entre certaines de nos expériences et celles d'autres groupes. Même en excluant des expérimentations techniquement trop éloignées, plusieurs contradictions subsistent. Sans remettre en cause la qualité expérimentale de chacun, nous discuterons ici des origines possibles de ces variations. Par exemple, l'inhibition de la protéase HslV par l'équipe de Li et coll. (Li *et al.*, 2008) génère une sur-réplication et une mis-ségrégation du kinétoplaste. La même expérience menée dans notre laboratoire et répétée à maintes reprises, permet d'observer essentiellement des cellules multinucléées et de façon minoritaire, des kinétoplastes ségrégeant de façon

anormale. De plus, l'inhibition de HslU1 dans notre laboratoire, de même que la double inhibition HslU1+HslU2, conduit à une augmentation importante des cellules avec plus de 2 kinétoplastes, phénotype à peine mentionné comme très minoritaire par Li et coll. qui observent plutôt, en inhibant à la fois HslU1 et HslU2, les mêmes effets que ceux obtenus avec l'inhibition de HslV.

Pourquoi de tels résultats contradictoires ?

Si, dans une souche, la population cellulaire a, à des mutations près, un contenu génétique quasi-identique, rien, à ce jour, n'indique que chaque cellule a une transcription des CDS et une expression des protéines parfaitement identique à ses voisines. En réalité, l'expression des gènes codant pour les VSG chez *T. brucei* indique même le contraire. En effet, au niveau d'une même souche, c'est la fluctuation de l'expression de certains de ces gènes qui rend possible la survie de la population, en permettant l'échappement aux défenses immunitaires de l'hôte. Dans notre exemple, l'inhibition de l'expression de la protéine HslV pourrait, selon le contexte cellulaire, c'est-à-dire selon la dominance de tel ou tel niveau/ensemble de transcription dans la population, induire en définitive des phénotypes différents.

A l'extrême, nous avons observé pour la lignée T181, un résultat totalement contradictoire avec celui de Subramaniam et coll. (Subramaniam *et al.*, 2006), avec respectivement aucun effet ou, au contraire, un effet sévère sur la croissance. Si on admet de part et d'autre une même rigueur expérimentale, l'hypothèse d'une variation de l'expression des gènes entre ces deux lignées d'une même souche, devient en réalité la seule hypothèse raisonnable. L'absence ou la présence d'un ou plusieurs intermédiaire(s) ou partenaire(s) protéiques dominants dans l'une ou l'autre des lignées pourrait ainsi induire ou non le phénotype.

Le protéasome HslVU : une cible thérapeutique potentielle ?

Au total, ce travail a permis à la fois de clore certaines questions contradictoires concernant le protéasome HslVU chez les Trypanosomatidés et d'ouvrir de nombreuses voies de recherche concernant le rôle des protéines mitochondriales de fonction inconnue, et en particulier leur implication éventuelle dans le cycle cellulaire "associé au kinétoplaste". Ces deux questions sont davantage liées qu'il n'y paraît si on conserve l'idée d'un rôle putatif de HslVU dans la régulation de protéines associées au cycle cellulaire.

Par ailleurs, et indépendamment des résultats attendus sur le rôle précis de ce protéasome, plusieurs auteurs ont souligné l'importance de ce complexe comme cible thérapeutique potentielle contre les Trypanosomatidés (Li *et al.*, 2008, Chrobak *et al.*, 2012). En effet, le caractère essentiel d'une part, et l'absence de ce protéasome dans la cellule hôte du parasite

d'autre part, en font une cible spécifique pertinente. C'est pourquoi un projet pluridisciplinaire "informel" est né au début de ce travail, impliquant plusieurs équipes montpelliéraines, dont des biochimistes spécialistes du protéasome (Olivier Coux, CRBM, UMR CNRS 5237), des chimistes (Jean-François Hernandez, Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR CNRS 5247) et un biologiste structural (Andrey Kajava, CRBM, UMR CNRS 5237), avec pour objectif l'inhibition de ce complexe chez le parasite *in vivo*.

La première question posée a été : quelle(s) activité(s) de ce protéasome est-il judicieux de cibler ? Si l'on pense en premier lieu à son activité principale de protéolyse, cette piste pourrait s'avérer délicate : en effet, il est difficile de définir un inhibiteur qui ciblerait cette seule activité au niveau de ce protéasome parce que HslV possède des caractéristiques semblables à celles des sous-unités β catalytiques du protéasome 20S avec un repliement semblable et deux Thréonines N-terminales et une Lysine en position 33 jouant un rôle essentiel dans la catalyse (Yoo *et al.*, 1997b, De Mot *et al.*, 1999, Bochtler *et al.*, 2000), et HslV est également inhibée par des inhibiteurs du protéasome classique tels que MG-132 et la lactacistine (Rohrwild *et al.*, 1996, Ramasamy *et al.*, 2007), et son inhibition visant cette seule activité risque par conséquent d'impacter également l'hôte humain. Pour cette raison, certaines équipes (nous, pour ce projet et (Rathore *et al.*, 2011)) se sont orientées vers une inhibition de l'activation de HslV par la sous-unité HslU. L'interaction de ces deux protéines est aujourd'hui bien connue et détaillée : elle s'exerce par l'extrémité C-terminale de HslU qui, activant un changement de conformation structurale des protéines HslV (organisées en double hexamère), stimule l'activité protéolytique de ce complexe.

L'objectif du projet est ainsi de dessiner des molécules mimant cette extrémité C-terminale de HslU et d'en saturer les sites de HslV, ce qui inhiberait l'activité de HslVU indispensable à la croissance du parasite.

Ce projet nécessite la conception de molécules (pseudo-peptides) ayant une forte affinité pour les sites de HslV et contrariant l'activité de HslU1, et bien sûr leur vectorisation vers la mitochondrie. Ce programme est sans doute ambitieux, mais la réalisation de ses objectifs semble possible, à condition qu'il n'y ait pas de nouvelle réponse inattendue du parasite.

MATERIELS ET

METHODES

A. Souches et conditions de culture

A.1 : Souche Friedlin de *Leishmania major*

La souche utilisée est la souche de référence *Leishmania major* Friedlin, (code OMS: MHOM/IL/81/Friedlin). Elle est maintenue sous forme promastigote dans du milieu RPMI 1640 + GlutaMAX contenant 25mM d'HEPES (GIBCO - Invitrogen) enrichi par addition de 20% de sérum de veau fœtal (SVF) préalablement décomplémenté (30 minutes à 56 °C), d'acides aminés essentiels et non essentiels (1% v/v) et de pyruvate de sodium (1mM). La culture est incubée à 26°C avec 5 % de CO₂ en atmosphère humide. Afin de maintenir les promastigotes en phase exponentielle de croissance, la culture est répliquée trois fois par semaine (la concentration cellulaire variant entre 10⁶ et 10⁷ cellules/ml) (Dubessay *et al.*, 2004).

A.2 : Souche de *Trypanosoma brucei*, formes procycliques

La lignée de Trypanosomes procycliques, *T.b.brucei* 29-13 est dérivée de la souche procyclique 427 (Wirtz *et al.*, 1999). Cette lignée a été successivement transformée, de façon stable, par le vecteur pLew13, exprimant la T7 RNA polymérase (T7RNAP) ainsi que le gène codant le répresseur de l'opéron tétracycline. L'intégration de cette construction qui contient également le gène de résistance à la néomycine (NEO), est sélectionnée par la généticine. Ce vecteur a été inséré au niveau du gène de la β -tubuline. Puis par le vecteur pLew29 contenant le gène codant le répresseur de l'opéron tétracycline sous contrôle du promoteur T7 muté. Cette construction est sélectionnée par le gène de résistance à l'hygromycine (HYG). Il a été introduit dans le locus de RNP1. La souche ainsi transfectée contient deux gènes codant le répresseur de l'opéron tétracycline dont un est sous le contrôle d'un promoteur T7 muté qui permet d'ajuster de façon optimale le niveau d'expression de ce gène (Figure MM1). Ces Trypanosomes sont facilement cultivables *in vitro*, à 27°C, en milieu SDM-79 contenant 10% de SVF et 7 μ g/ml d'hémine. 10 μ g/ml de généticine (Euromedex) et 30 μ g/ml d'hygromycine (Euromedex) sont ajoutés au milieu pour maintenir les deux cassettes (une encodant l'ARN

polymérase du phage T7 et l'autre, le répresseur sensible à la tétracycline). Les parasites sont cultivés entre 3.10^5 et 2.10^7 cellules/ml.

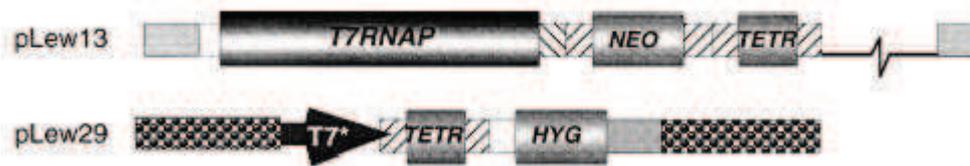


Figure 32 : Vecteurs intégrés dans la lignée 29-13 de *T. brucei*. (Wirtz *et al.*, 1999).

A.3 : Souche de *Trypanosoma brucei*, formes sanguines

La souche de trypanosomes de formes sanguines 427 MiTat 1.2 (Hirumi *et al.*, 1989) exprime, comme la souche procyclique, l'ARN polymérase de phage T7 et le répresseur bactérien sensible à la tétracycline. Ces trypanosomes sont cultivables *in vitro*, à 37°C, dans le milieu IMDM (GIBCO – Invitrogen) contenant 5% de CO₂ complétementé avec 10% de SVF. 2,5µg/ml de généticine et 5µg/ml d'hygromycine sont ajoutés au milieu afin de maintenir les deux cassettes (l'ARN polymérase du phage T7 et le répresseur sensible à la tétracycline). Les parasites sont cultivés entre 10^5 et 3.10^6 cellules/ml.

B. Manipulation des Leishmanies

B.1 : Construction des vecteurs d'expression des protéines fusionnées à la GFP : pTH₆nGFPc et pTH₆cGFPn

Amplification par PCR : les gènes codant pour les protéines du complexe LmHslVU (Annotation dans GeneDB : LmHslV: LmjF36.3990, LmHslU1: LmjF15.0090 et LmHslU2: LmjF09.0230) ont été amplifiés à partir d'ADN génomique extrait de la souche mère de *Leishmania major*, à l'aide d'amorces d'oligonucléotides spécifiques (énumérées dans le tableau S1 de l'article 1), contenant les sites de restriction MfeI (CAATTG) et HpaI

(GTTAAC) permettant de pouvoir insérer les fragments d'ADN amplifiés dans différents vecteurs (vecteurs de clonage puis vecteurs d'expression).

Clonage des séquences cibles : les produits de PCR purifiés ont été ligués dans le vecteur de clonage pGEM-T easy (Promega) pour être multipliés dans des bactéries (*Escherichia coli*, JM109). Les vecteurs recombinants ont ensuite été extraits par minipreps et digérés pour purification sur gel d'agarose 1% des séquences cibles (inserts).

Préparation des vecteurs d'expression : Les inserts purifiés ont ensuite été clonés dans les vecteurs d'expression pTH₆nGFPc et pTH₆cGFPn construits au laboratoire à partir du plasmide Bluescript II KS(+) (Dubessay *et al.*, 2006). Ces vecteurs permettent l'expression de protéines fusionnées à la GFP à leur extrémité C-terminale ou N-terminale, respectivement. La sélection des clones positifs se fait à l'aide de deux gènes de résistances, l'un à l'ampicilline pour les cultures bactériennes et l'autre à l'hygromycine pour les cultures de *Leishmania*. La conservation du cadre de lecture des protéines de fusion a été systématiquement vérifiée par séquençage des constructions plasmidiques avant transfection des parasites.

B.2 : Transfection par électroporation

5.10⁷ cellules de *Leishmania major* sont lavées (2500rpm/10min à 4°C) dans du Cytomix (120 mM KCl/ 0,15 mM CaCl₂/ 10 mM K₂HPO₄/ 25 mM Hepes (pH7.6) / 2 mM EDTA/ 5 mM MgCl₂), puis resuspendues dans 500µl de Cytomix à 4°C. Dans une cuve d'électroporation de 4mm, les 500µl de cellules sont mélangées à 80µg d'ADN plasmidique (dissous dans 50µl d'eau stérile) et incubés 10 minutes sur glace. Les cellules sont ensuite électroporées à l'aide d'un électroporateur Bio-Rad Gene Pulser, programme « square wave » : 1500 V, 2 pulses de 0,5ms avec 10sec entre les deux pulses. Les cellules électroporées sont ensuite incubées 10 minutes sur glace avant leur mise en culture dans du milieu frais. L'antibiotique de sélection, l'Hygromycine B (Euromedex) est rajouté au milieu de culture le lendemain à une concentration de 30µg/ml. Les transfectants stables sont obtenus au bout de 7 à 14 jours suivant la transfection (Casanova *et al.*, 2008).

C. Manipulation des Trypanosomes

C.1 : Construction des lignées cellulaires de *T. brucei* exprimant des protéines de fusion –GFP ou C-Myc

Les gènes codant pour les protéines du complexe TbHslVU (Annotation dans GeneDB : TbHslV: Tb927.11.10240, précédemment annoté Tb11.01.2000, TbHslU1: Tb927.5.1520 et TbHslU2: Tb927.11.12230 précédemment annoté Tb11.01.4050) ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN génomique en utilisant des amorces d'oligonucléotides (énumérées dans le tableau S1 de l'article 1), contenant les sites de restriction XhoI (CTCGAG) et XbaI (TCTAGA) permettant de pouvoir insérer les fragments d'ADN amplifiés dans différents vecteurs (vecteurs de clonage puis vecteurs d'expression).

Clonage des séquences cibles et préparation des vecteurs d'expression : les produits de PCR purifiés ont été successivement clonés dans le vecteur pGEM-Teasy (Promega), puis dans le vecteur pLew79GFPc/n (généreusement fourni par Frédéric Bringaud, Université Bordeaux 2 - Victor Segalen). Ce vecteur, permettant l'expression de protéines fusionnées à la GFP au niveau de leur extrémité C-terminale ou N-terminale, est inductible à la tétracycline. Il contient un promoteur T7 comportant la séquence liant la polymérase T7 et l'opérateur sensible à la tétracycline et un gène de résistance à la phléomycine. Il contient de plus un site de restriction NotI dans une région permettant l'intégration de la construction linéarisée par recombinaison homologe au niveau du « spacer » silencieux du locus ribosomal, après transfection dans des cellules de *T. brucei*. Cette région est transcriptionnellement silencieuse, ce qui permettra l'expression de la cassette uniquement au moment de l'induction. Dans les vecteurs d'expression c-Myc, contenant les sites de restriction MfeI (CAATTG) et HpaI (GTTAAC), utilisés dans les expériences de complémentation, la séquence du gène de la GFP a été remplacée par l'épitope c-Myc et le gène de résistance à la phléomycine par celui de la blasticidine. Pour ces expériences, les protéines LmHslU1, TbHslU1 et TbHslU2 (c-Myc fusionnés aux extrémités N-terminales des séquences) ont été surexprimées respectivement dans les lignées cellulaires RNAi-TbHslU1, RNAi-TbHslU2 et RNAi-TbHslU1. D'autres expériences de complémentation ont été effectuées en surexprimant les protéines LmHslU1 et LmHslU2 non taguées dans les lignées RNAi-TbHslU2. LmHslU1 et LmHslU2 étant

exprimées dans des vecteurs pLew79GFP délétés de la séquence du gène de la GFP (par ajout d'un codon stop en début de séquence). L'expression des protéines surexprimées a de plus été effectuée en système inductible et non inductible (avec et sans séquence de l'opérateur, respectivement). La conservation du cadre de lecture des protéines de fusion a été systématiquement vérifiée par séquençage des constructions plasmidiques avant transfection des parasites.

C.2 : Technique d'invalidation de l'expression des gènes par ARN interférence

Le plasmide utilisé pour le RNAi chez *T.brucei* est le p2T7 (un plasmide p2T7tiB/GFP (LaCount *et al.*, 2002) modifié). Il contient le gène de résistance à la phléomycine, deux promoteurs hybrides disposés en tête bêche comportant la séquence liant la polymérase T7 et l'opérateur sensible à la tétracycline et une région permettant l'intégration de la construction au niveau du « spacer » silencieux du locus ribosomal, région transcriptionnellement silencieuse, permettant l'expression de la cassette uniquement au moment de l'induction.

Des fragments de 400 à 600 paires de bases des gènes codants pour les différents gènes du complexe TbHslVU (Annotation dans GeneDB : TbHslV: Tb927.11.10240, précédemment annoté Tb11.01.2000, TbHslU1: Tb927.5.1520 et TbHslU2: Tb927.11.12230 précédemment annoté Tb11.01.4050) ainsi que pour les gènes codant pour les protéines mitochondriales candidates ont été amplifiés par PCR en utilisant les couples d'amorces d'oligonucléotides spécifiques (énumérés dans le tableau S1 de l'article 1 pour les gènes du complexe HslVU), contenant les sites de restriction *Hind*III (AAGCTT) et *Sac*II (CCGCGG) permettant l'insertion des fragments d'ADN amplifiés dans différents vecteurs (vecteurs de clonage puis vecteurs d'expression). La construction pour le double RNAi-TbHslU1 et TbHslU2 a été obtenue par ligation des deux portions de gènes de TbHslU1 et TbHslU2 dans le vecteur de RNAi. Les séquences cibles de RNAi ont été sélectionnées par soumission des séquences des gènes à un logiciel de prédiction d'oligonucléotides amorces, RNAit (<http://trypanofan.path.cam.ac.uk/software/RNAit.html>), conçu pour minimiser les risques d'effets hors-cibles (Redmond *et al.*, 2003). La conservation du cadre de lecture des protéines de fusion a également été systématiquement vérifiée par séquençage des constructions plasmidiques avant transfection des parasites.

C.3 : Transfection des cellules procycliques par électroporation

3.10^7 cellules procycliques de *T.b.brucei* 29-13 ou de lignées stables de RNAi-TbHslU1 et TbHslU2 (pour les expériences de complémentation) sont lavées deux fois (2500rpm/10min à 4°C) dans du Tampon ZPSM -pH7- (132 mM NaCl / 8 mM KCl/ 8 mM Na₂HPO₄ / 1,5 mM K₂HPO₄ / 0,5 mM Mg₄ acétate H₂O/ 90 µM Ca acétate H₂O), puis resuspendues dans 500µl de tampon ZPSM à 4°C. Dans une cuve d'électroporation de 4mm, les 500µl de cellules sont mélangées à 10µg d'ADN plasmidique linéarisé (dissous dans 40 à 50µl d'eau stérile) et incubés 10 minutes sur glace. Les cellules sont ensuite électroporées à l'aide d'un électroporateur Bio-Rad Gene Pulser, programme « Exponential Decay » : 1 pulse, 1500 V, 25µF. Les cellules électroporées sont ensuite immédiatement mises en culture dans du milieu frais enrichi avec 20% de sérum de vœu fœtal et contenant les deux antibiotiques de culture de la souche mère (10µg/ml de généticine et 30µg/ml d'hygromycine). L'antibiotique de sélection, la phléomycine (Euromedex) est rajouté au milieu de culture le lendemain à une concentration de 5µg/ml. Pour les expériences de complémentation, les cellules électroporées sont mises en culture dans du milieu frais enrichi avec 20% de sérum de vœu fœtal et contenant les trois antibiotiques de culture des lignées stables de RNAi (10µg/ml de généticine, 30µg/ml d'hygromycine et 5µg/ml de phléomycine). L'antibiotique de sélection, la blasticidine (Euromedex) est rajouté au milieu de culture le lendemain à une concentration de 10µg/ml. Les transfectants stables sont obtenus au bout de 7 à 14 jours suivant la transfection (Blaineau *et al.*, 2007). L'induction de l'expression ou de l'inhibition des gènes est ensuite effectuée par ajout de 1µg/ml de tétracycline dans le milieu de culture.

C.4 : Transfection des cellules sanguines par nucléofection

Les milieux et tampons sont préalablement préchauffés à 37°C. La centrifugeuse est tournée à vide au préalable à 37°C. L'ensemble des étapes se déroule à 37°C pour maintenir au maximum les cellules à cette température durant toute la durée de la nucléofection.

10^7 cellules de formes sanguine de *T.b.brucei* MiTat 1.2 sont lavées (2000rpm/10min à 37°C) dans du Cytomix, puis resuspendues dans 100µl de tampon de nucléofection Human T-cell Nucleofector solution (Lonza / composition non fournie) à 37°C. Dans une cuvette de

nucléofection adaptée, les 100µl de cellules sont mélangées à 10µg d'ADN plasmidique linéarisé (dissous dans 10µl d'eau stérile). La nucléofection est immédiatement effectuée à l'aide de l'AMAXA Nucleofector II (Lonza), avec le programme X-001 (paramètres : cuvette gap de 2mm, pulse de 1,2kV, résistance de 186Ω, capacitance de 25µF). Les cellules nucléofectées sont immédiatementensemencées après impulsion dans 50ml de milieu de culture préchauffé à 37°C contenant les deux antibiotiques de culture de la souche mère (2,5µg/ml de généticine et 5µg/ml d'hygromycine). La culture bien mélangée par retournements est ensuite répartie dans deux plaques 24 puits (1ml/puits). Les cellules sont ensuite incubées au moins 6 heures (ou sur la nuit) à 37°C avant ajout de l'antibiotique de sélection. La phléomycine est incorporée en concentration doublée (2x 2,5µg/ml) dans 50ml de milieu de culture préchauffé à 37°C contenant les deux antibiotiques de culture de la souche mère. Ces 50ml de milieu sont réparties dans les deux plaques 24 puits (1ml/puits). Les nucléofectants stables sont rapidement obtenus au bout de 4 à 6 jours suivant la nucléofection. L'induction de l'expression ou de l'inhibition des gènes est ensuite effectuée par ajout de 1µg/ml de tétracycline dans le milieu de culture.

D. Northern blot

D.1 : Préparation d'extraits d'ARN de trypanosomes

Les ARN totaux sont extraits à partir de $2,5 \cdot 10^8$ cellules procycliques ($5 \cdot 10^7$ cellules sanguines) de *T.brucei* avec le kit d'extraction RNeasy (Qiagen).

D.2 : Northern blot

1

0 à 20µg d'extraits d'ARN sont dénaturés dans une solution de MOPS 2x (40mM MOPS, 4mM sodium acetate, 2mM EDTA pH7), de formaldéhyde 9,25% et de formamide déionisé 50%, puis incubés 10 minutes à 65°C et 10 minutes dans la glace, avant d'être séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (agarose 1,4%, formaldéhyde 6%, MOPS 1x). Après migration (2-3h à 80-100mA), la qualité des ARN est contrôlée sous UV, le gel est ensuite lavé 2x20minutes dans l'eau H₂O-DEPC puis équilibré 30 minutes dans du tampon SSC10X.

Les ARN sont ensuite transférés (transfert passif) sur membrane de Nylon N+-Hybond® (Amersham), sur la nuit. Après transfert, les ARN sont fixés par séchage de la membrane 45minutes à 80°C. La membrane est hybridée par incubation sur la nuit à 42°C avec une sonde spécifique du gène d'intérêt marquée au -dCTP[α^{32} P]. La détection de l'ARN d'intérêt se fait par autoradiographie.

E. Western blot

E.1 : Préparation d'extraits protéiques de trypanosomes

Le culot de 6.10^6 cellules procycliques de T.brucei est lavé dans 100 μ l de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma). Les cellules sont ensuite lysées 5 minutes à 100°C en tampon Laemmli 2X (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 0.01% bromophenol blue and 5% β -mercaptoethanol). L'équivalent de 2.10^6 cellules est généralement déposé par puits.

E.2 : Western blot

Les protéines sont séparées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE 10% et transférées sur membrane PVDF (transfert 1h à 115mA par immunobuvardage en conditions semi-humide). Les membranes sont ensuite saturées 1h dans une solution de TBS-lait 5% (TBS 1X, pH7,5 / Triton X-100 0,2% / lait écrémé 5g). Après saturation, les membranes sont incubées sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (souris) anti-c-Myc (Clontech) au 1/1000 dans du TBS-lait 5%. L'anticorps primaire est détecté par un anticorps secondaire (chèvre) anti-souris couplé à la peroxydase (Promega) utilisé au 1/1000 dans du TBS-lait 5%. La détection des protéines reconnues se fait par chimioluminescence (Kit ECL, Amersham).

F. Microscopie et imagerie par fluorescence

F.1 : Localisation intracellulaire par fluorescence

5.10⁶ cellules sont lavées en PBS 1X puis fixées 20 minutes à 4°C au paraformaldéhyde 4%. Après fixation, les cellules sont lavées deux fois en PBS 1X, resuspendues dans 200µl de PBS 1X puis déposées sur lames d'immunofluorescence (10µl/puits) pour séchage à l'air. Après séchage les cellules sont montées entre lames et lamelles en présence d'un mélange de Mowiol (Calbiochem) et de DAPI (4,6-diamino-2-phénylindole). Les cellules seront ainsi observées par contraste de phase et la fluorescence visualisée à l'aide de filtres appropriés, sur un microscope Zeiss Axioplan 2 avec un objectif 100X. Les images numériques sont capturées à l'aide d'une caméra CDD Photometrics coolSnap (Roper Scientific), et analysées avec le logiciel Metaview (Universal Imaging®).

F.2 : Détection par immunofluorescence

5.10⁶ cellules sont lavées en PBS 1X (bien les resuspendre) puis fixées 15 minutes à température ambiante au paraformaldéhyde 4%. Après fixation, les cellules sont lavées deux fois en PBS 1X, resuspendues dans 100µl de PBS 1X puis déposées sur lames d'immunofluorescence (10µl/puits) pour séchage en chambre humide. Les cellules sont ensuite lavées 10 minutes en Triton 0,2% dans du PBS-SVF20%, suivi de trois lavages de 10 minutes en PBS-SVF20% et d'une saturation 45 minutes en PBS-SVF20%. Le tampon de saturation est ensuite retiré et les cellules sont incubées 1h à température ambiante avec l'anticorps primaire anti-cMyc au 1/500 dans du PBS-SVF20% suivi par 4 lavages de 5 minutes en PBS-SVF20%. Les cellules sont ensuite incubées à l'obscurité 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire de lapin, anti-IgG de souris conjugué à l'Alexa Fluor 546 (Molecular Probes) au 1/500 dans du PBS-SVF20%. Suivent ensuite 2 lavages de 5 minutes en PBS-SVF20% et deux autres en PBS 1X. Les lames sont ensuite séchées à l'air (à l'obscurité). Après séchage les cellules sont montées entre lames et lamelles en présence d'un mélange de Mowiol (Calbiochem) et de DAPI (4,6-diamino-2-phénylindole). Les cellules seront ainsi observées par contraste de phase et la fluorescence visualisée à l'aide de filtres

appropriés, sur un microscope Zeiss Axioplan 2 avec un objectif 100X. Les images numériques sont capturées à l'aide d'une caméra CDD Photometrics coolSnap (Roper Scientific), et analysées avec le logiciel Metaview (Universal Imaging®).

F.3 : Marquage spécifique de la mitochondrie au MitoTracker

$5 \cdot 10^6$ cellules sont incubées à l'obscurité 10 min à 27 ° C dans 500µl de solution de MitoTracker CMXRos rouge (Molecular Probes) à 100 nM dans du milieu de culture sans SVF. Les cellules sont ensuite lavées dans 500µl de milieu de culture sans SVF puis resuspendues dans 500µl de milieu complet (contenant les antibiotiques de culture). Elles sont ensuite incubées au moins 30 minutes à la température de culture des cellules (26-27°C). Après marquage, les cellules sont fixées selon le même protocole que pour la fluorescence.

REFERENCES

- Adler, S. (1964). LEISHMANIA. *Adv Parasitol* **2**, 35-96.
- Alexeieff, A. (1917) C.R. Soc. Biol. (Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie) Paris. pp. 517-514.
- Alsford, S., Wickstead, B., Ersfeld, K. and Gull, K. (2001). Diversity and dynamics of the minichromosomal karyotype in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **113**, 79-88.
- Alvar, J., Velez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., *et al.* (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One* **7**, e35671.
- Alvarez, F., Robello, C. and Vignali, M. (1994). Evolution of codon usage and base contents in kinetoplastid protozoans. *Mol Biol Evol* **11**, 790-802.
- Alvarez-Castelao, B. and Castano, J.G. (2005) Mechanism of direct degradation of I κ B α by 20S proteasome. In *FEBS Lett.* Netherlands, pp. 4797-4802.
- Ambit, A., Woods, K.L., Cull, B., Coombs, G.H. and Mottram, J.C. (2011). Morphological events during the cell cycle of *Leishmania major*. *Eukaryot Cell* **10**, 1429-1438.
- Anonymous (2008) The Global Burden of Disease: 2004 update. World Health Organization, pp. 84.
- Aronow, B., Kaur, K., McCartan, K. and Ullman, B. (1987). Two high affinity nucleoside transporters in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* **22**, 29-37.
- Arrigo, A.P., Tanaka, K., Goldberg, A.L. and Welch, W.J. (1988). Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* **331**, 192-194.
- Azim, M.K., Goehring, W., Song, H.K., Ramachandran, R., Bochtler, M. and Goettig, P. (2005). Characterization of the HslU chaperone affinity for HslV protease. *Protein Sci* **14**, 1357-1362.
- Bailey, H. and Bishop, W.J. (1959). Leishman-Donovan bodies and donovaniasis; Sir William Boog Leishman, 1865-1926; Charles Donovan, 1863-1951. *Br J Vener Dis* **35**, 8-9.
- Bakker, B.M., Michels, P.A., Opperdoes, F.R. and Westerhoff, H.V. (1999). What controls glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*? *J Biol Chem* **274**, 14551-14559.
- Baldauf, S.L. (2003). The deep roots of eukaryotes. *Science* **300**, 1703-1706.
- Banuls, A.L., Bastien, P., Pomares, C., Arevalo, J., Fisa, R. and Hide, M. (2011). Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. *Clin Microbiol Infect* **17**, 1451-1461.
- Barboza, N.R., Cardoso, J., de Paula Lima, C.V., Soares, M.J., Gradia, D.F., Hangai, N.S., *et al.* (2012). Expression profile and subcellular localization of HslV, the proteasome related protease from *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* **130**, 171-177.
- Barrett, M.P., Boykin, D.W., Brun, R. and Tidwell, R.R. (2007). Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *Br J Pharmacol* **152**, 1155-1171.
- Barrett, M.P., Burchmore, R.J., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasch, A.C., Cazzulo, J.J. and Krishna, S. (2003). The trypanosomiasis. *Lancet* **362**, 1469-1480.
- Barton, L.F., Runnels, H.A., Schell, T.D., Cho, Y., Gibbons, R., Tevethia, S.S., *et al.* (2004). Immune defects in 28-kDa proteasome activator gamma-deficient mice. *J Immunol* **172**, 3948-3954.
- Bass, K.E. and Wang, C.C. (1991). The in vitro differentiation of pleomorphic *Trypanosoma brucei* from bloodstream into procyclic form requires neither intermediary nor short-stumpy stage. *Mol Biochem Parasitol* **44**, 261-270.
- Bastien, P., Blaineau, C. and Pages, M. (1992a). Leishmania: sex, lies and karyotype. *Parasitol Today* **8**, 174-177.

- Bastien, P., Blaineau, C. and Pages, M. (1992b). Molecular karyotype analysis in Leishmania. *Subcell Biochem* **18**, 131-187.
- Bastin, P., Ellis, K., Kohl, L. and Gull, K. (2000a). Flagellum ontogeny in trypanosomes studied via an inherited and regulated RNA interference system. *J Cell Sci* **113** (Pt **18**), 3321-3328.
- Bastin, P., Pullen, T.J., Moreira-Leite, F.F. and Gull, K. (2000b). Inside and outside of the trypanosome flagellum: a multifunctional organelle. *Microbes Infect* **2**, 1865-1874.
- Bastin, P., Sherwin, T. and Gull, K. (1998). Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature* **391**, 548.
- Bates, P.A. (2007). Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* **37**, 1097-1106.
- Bates, P.A. and Rogers, M.E. (2004). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. *Curr Mol Med* **4**, 601-609.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. and Seemuller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-380.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renault, H., Bartholomeu, D.C., *et al.* (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* **309**, 416-422.
- Blaineau, C., Tessier, M., Dubessay, P., Tasse, L., Crobu, L., Pages, M. and Bastien, P. (2007). A novel microtubule-depolymerizing kinesin involved in length control of a eukaryotic flagellum. *Curr Biol* **17**, 778-782.
- Blum, B., Bakalara, N. and Simpson, L. (1990). A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell* **60**, 189-198.
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M. and Huber, R. (1997). Crystal structure of heat shock locus V (HsIV) from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6070-6074.
- Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H.K., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D. and Huber, R. (2000). The structures of HsIU and the ATP-dependent protease HsIU-HsIV. *Nature* **403**, 800-805.
- Borst, P. and Ulbert, S. (2001). Control of VSG gene expression sites. *Mol Biochem Parasitol* **114**, 17-27.
- Bossis, G., Ferrara, P., Acquaviva, C., Jariel-Encontre, I. and Piechaczyk, M. (2003). c-Fos proto-oncoprotein is degraded by the proteasome independently of its own ubiquitinylation in vivo. *Mol Cell Biol* **23**, 7425-7436.
- Bouzat, J.L., McNeil, L.K., Robertson, H.M., Solter, L.F., Nixon, J.E., Beever, J.E., *et al.* (2000). Phylogenomic analysis of the alpha proteasome gene family from early-diverging eukaryotes. *J Mol Evol* **51**, 532-543.
- Brannigan, J.A., Dodson, G., Duggleby, H.J., Moody, P.C., Smith, J.L., Tomchick, D.R. and Murzin, A.G. (1995). A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* **378**, 416-419.
- Briggs, L.J., McKean, P.G., Baines, A., Moreira-Leite, F., Davidge, J., Vaughan, S. and Gull, K. (2004). The flagella connector of *Trypanosoma brucei*: an unusual mobile transmembrane junction. *J Cell Sci* **117**, 1641-1651.
- Broadhead, R., Dawe, H.R., Farr, H., Griffiths, S., Hart, S.R., Portman, N., *et al.* (2006). Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature* **440**, 224-227.
- Buffet, P.A., Rosenthal, E., Gangneux, J.P., Lightburne, E., Couppie, P., Morizot, G., *et al.* (2011). [Therapy of leishmaniasis in France: consensus on proposed guidelines]. *Presse Med* **40**, 173-184.

- Bush, K.T., Goldberg, A.L. and Nigam, S.K. (1997). Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *J Biol Chem* **272**, 9086-9092.
- Casanova, M., Portales, P., Blaineau, C., Crobu, L., Bastien, P. and Pages, M. (2008). Inhibition of active nuclear transport is an intrinsic trigger of programmed cell death in trypanosomatids. *Cell Death Differ* **15**, 1910-1920.
- Cavalier-Smith, T. (1993). Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev* **57**, 953-994.
- Christensen, C.B., Jorgensen, L., Jensen, A.T., Gasim, S., Chen, M., Kharazmi, A., *et al.* (2000). Molecular characterization of a *Leishmania donovani* cDNA clone with similarity to human 20S proteasome a-type subunit. *Biochim Biophys Acta* **1500**, 77-87.
- Christophers, S.R., Shortt, H.E. and Barraud, P.J. (1926) The morphology and life cycle of the parasite of Indian kala-azar in culture, Indian medical research memoirs.
- Chrobak, M., Forster, S., Meisel, S., Pfefferkorn, R., Forster, F. and Clos, J. (2012). *Leishmania donovani* HslV does not interact stably with HslU proteins. *Int J Parasitol* **42**, 329-339.
- Chuang, S.E. and Blattner, F.R. (1993a). Characterization of twenty-six new heat shock genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**, 5242-5252.
- Chuang, S.E., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Daniels, D.L. and Blattner, F.R. (1993b). Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the hslTS/ibpAB and hslVU operons in *Escherichia coli*. *Gene* **134**, 1-6.
- Chung, C.H. and Goldberg, A.L. (1981). The product of the lon (capR) gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4931-4935.
- Clayton, C., Hausler, T. and Blattner, J. (1995). Protein trafficking in kinetoplastid protozoa. *Microbiol Rev* **59**, 325-344.
- Clayton, C.E. (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* **21**, 1881-1888.
- Clayton, C.E. and Michels, P. (1996). Metabolic compartmentation in African trypanosomes. *Parasitol Today* **12**, 465-471.
- Couvreur, B., Wattiez, R., Bollen, A., Falmagne, P., Le Ray, D. and Dujardin, J.C. (2002). Eubacterial HslV and HslU subunits homologs in primordial eukaryotes. *Mol Biol Evol* **19**, 2110-2117.
- Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A.L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* **65**, 801-847.
- Cross, G.A. (1975). Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* **71**, 393-417.
- Cross, G.A. (1990). Cellular and genetic aspects of antigenic variation in trypanosomes. *Annu Rev Immunol* **8**, 83-110.
- Cross, G.A. (1996). Antigenic variation in trypanosomes: secrets surface slowly. *Bioessays* **18**, 283-291.
- Cross, M., Taylor, M.C. and Borst, P. (1998). Frequent loss of the active site during variant surface glycoprotein expression site switching in vitro in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* **18**, 198-205.
- Dacks, J.B. and Doolittle, W.F. (2001). Reconstructing/deconstructing the earliest eukaryotes: how comparative genomics can help. *Cell* **107**, 419-425.
- Dahlmann, B., Kopp, F., Kuehn, L., Niedel, B., Pfeifer, G., Hegerl, R. and Baumeister, W. (1989) The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaeobacteria. In *FEBS Lett.* Netherlands, pp. 125-131.

- Das, A., Gale, M., Jr., Carter, V. and Parsons, M. (1994). The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces defects in cytokinesis and organellar genome segregation in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* **107** (Pt 12), 3477-3483.
- Davies, K.P., Carruthers, V.B. and Cross, G.A. (1997). Manipulation of the vsg co-transposed region increases expression-site switching in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **86**, 163-177.
- De Mot, R., Nagy, I., Walz, J. and Baumeister, W. (1999). Proteasomes and other self-compartmentalizing proteases in prokaryotes. *Trends Microbiol* **7**, 88-92.
- Dedet, J.P. (1999) Les leishmanioses.
- Demartino, G.N. and Gillette, T.G. (2007) Proteasomes: machines for all reasons. In *Cell*. United States, pp. 659-662.
- Descoteaux, A. and Turco, S.J. (1999). Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta* **1455**, 341-352.
- Desjardins, M. and Descoteaux, A. (1997). Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med* **185**, 2061-2068.
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C. and Rechsteiner, M. (1994). A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* **269**, 7059-7061.
- Dubessay, P., Blaineau, C., Bastien, P. and Pages, M. (2004). Chromosome fragmentation in leishmania. *Methods Mol Biol* **270**, 353-378.
- Dubessay, P., Blaineau, C., Bastien, P., Tasse, L., Van Dijk, J., Crobu, L. and Pages, M. (2006). Cell cycle-dependent expression regulation by the proteasome pathway and characterization of the nuclear targeting signal of a *Leishmania major* Kin-13 kinesin. *Mol Microbiol* **59**, 1162-1174.
- Edmunds, T. and Pennington, R.J. (1982). A high molecular weight peptide hydrolase in erythrocytes. *Int J Biochem* **14**, 701-703.
- El-Sayed, N.M., Hegde, P., Quackenbush, J., Melville, S.E. and Donelson, J.E. (2000). The African trypanosome genome. *Int J Parasitol* **30**, 329-345.
- Eleuteri, A.M., Cuccioloni, M., Bellesi, J., Lupidi, G., Fioretti, E. and Angeletti, M. (2002). Interaction of Hsp90 with 20S proteasome: thermodynamic and kinetic characterization. *Proteins* **48**, 169-177.
- Elias, M.C., da Cunha, J.P., de Faria, F.P., Mortara, R.A., Freymuller, E. and Schenkman, S. (2007). Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. *Protist* **158**, 147-157.
- Etlinger, J.D. and Goldberg, A.L. (1977). A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 54-58.
- Fan, C.M. and Maniatis, T. (1991). Generation of p50 subunit of NF-kappa B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature* **354**, 395-398.
- Farr, H. and Gull, K. (2009). Functional studies of an evolutionarily conserved, cytochrome b5 domain protein reveal a specific role in axonemal organisation and the general phenomenon of post-division axonemal growth in trypanosomes. *Cell Motil Cytoskeleton* **66**, 24-35.
- Ferrell, K., Wilkinson, C.R., Dubiel, W. and Gordon, C. (2000) Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. In *Trends Biochem Sci*. England, pp. 83-88.
- Forde, R.M. (1902) Some Clinical Notes on a European Patient whose Blood a *Trypanosoma* was Observed. In *J of Trop Med*. pp. 261-262.
- Franch, H.A. and Price, S.R. (2005). Molecular signaling pathways regulating muscle proteolysis during atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **8**, 271-275.

- Gilinger, G. and Bellofatto, V. (2001). Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res* **29**, 1556-1564.
- Gille, C., Goede, A., Schloetelburg, C., Preissner, R., Kloetzel, P.M., Gobel, U.B. and Frommel, C. (2003) A comprehensive view on proteasomal sequences: implications for the evolution of the proteasome. In *J Mol Biol.* England, pp. 1437-1448.
- Glickman, M.H. and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**, 373-428.
- Glotzer, M., Murray, A.W. and Kirschner, M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138.
- Goff, S.A. and Goldberg, A.L. (1985). Production of abnormal proteins in E. coli stimulates transcription of lon and other heat shock genes. *Cell* **41**, 587-595.
- Goldberg, A.L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**, 895-899.
- Goldberg, B., Yarlett, N., Sufrin, J., Lloyd, D. and Bacchi, C.J. (1997). A unique transporter of S-adenosylmethionine in African trypanosomes. *FASEB J* **11**, 256-260.
- Gottesman, S. (2003). Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 565-587.
- Greenwood, B.M. and Whittle, H.C. (1980). The pathogenesis of sleeping sickness. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **74**, 716-725.
- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., *et al.* (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* **7**, 1062-1067.
- Groll, M., Bochtler, M., Brandstetter, H., Clausen, T. and Huber, R. (2005). Molecular machines for protein degradation. *ChemBiochem* **6**, 222-256.
- Groll, M. and Clausen, T. (2003a) Molecular shredders: how proteasomes fulfill their role. In *Curr Opin Struct Biol.* England, pp. 665-673.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463-471.
- Groll, M. and Huber, R. (2003b) Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. In *Int J Biochem Cell Biol.* England, pp. 606-616.
- Gull, K. (1999). The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu Rev Microbiol* **53**, 629-655.
- Haag, J., O'HUigin, C. and Overath, P. (1998). The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. *Mol Biochem Parasitol* **91**, 37-49.
- Hammarton, T.C., Clark, J., Douglas, F., Boshart, M. and Mottram, J.C. (2003a). Stage-specific differences in cell cycle control in *Trypanosoma brucei* revealed by RNA interference of a mitotic cyclin. *J Biol Chem* **278**, 22877-22886.
- Hammarton, T.C., Monnerat, S. and Mottram, J.C. (2007). Cytokinesis in trypanosomatids. *Curr Opin Microbiol* **10**, 520-527.
- Hammarton, T.C., Mottram, J.C. and Doerig, C. (2003b). The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. *Prog Cell Cycle Res* **5**, 91-101.
- Havens, C.G., Bryant, N., Asher, L., Lamoreaux, L., Perfetto, S., Brendle, J.J. and Werbovetz, K.A. (2000). Cellular effects of leishmanial tubulin inhibitors on *L. donovani*. *Mol Biochem Parasitol* **110**, 223-236.
- Hecker, M., Schumann, W. and Volker, U. (1996). Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**, 417-428.
- Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J.A., Saidowsky, J., Escher, C. and Wolf, D.H. (1991). Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *EMBO J* **10**, 555-562.

- Hengge, R. and Bukau, B. (2003). Proteolysis in prokaryotes: protein quality control and regulatory principles. *Mol Microbiol* **49**, 1451-1462.
- Hershko, A., Ganoh, D., Pehrson, J., Palazzo, R.E. and Cohen, L.H. (1991). Methylated ubiquitin inhibits cyclin degradation in clam embryo extracts. *J Biol Chem* **266**, 16376-16379.
- Hirumi, H. and Hirumi, K. (1989). Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. *J Parasitol* **75**, 985-989.
- Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* **30**, 405-439.
- Hotez, P.J., Remme, J.H., Buss, P., Alleyne, G., Morel, C. and Breman, J.G. (2004). Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clin Infect Dis* **38**, 871-878.
- Hsieh, F.C., Chen, C.T., Weng, Y.T., Peng, S.S., Chen, Y.C., Huang, L.Y., *et al.* (2011). Stepwise activity of ClpY (HslU) mutants in the processive degradation of *Escherichia coli* ClpYQ (HslUV) protease substrates. *J Bacteriol* **193**, 5465-5476.
- Hua, S., To, W.Y., Nguyen, T.T., Wong, M.L. and Wang, C.C. (1996). Purification and characterization of proteasomes from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **78**, 33-46.
- Huang, H. and Goldberg, A.L. (1997). Proteolytic activity of the ATP-dependent protease HslVU can be uncoupled from ATP hydrolysis. *J Biol Chem* **272**, 21364-21372.
- Igarashi, K. and Kashiwagi, K. (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* **271**, 559-564.
- Isnard, A., Shio, M.T. and Olivier, M. (2012). Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Front Cell Infect Microbiol* **2**, 72.
- Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., *et al.* (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**, 436-442.
- Jaenisch, R. and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* **33 Suppl**, 245-254.
- Janse, D.M., Crosas, B., Finley, D. and Church, G.M. (2004). Localization to the proteasome is sufficient for degradation. *J Biol Chem* **279**, 21415-21420.
- Jelinsky, S.A. and Samson, L.D. (1999). Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1486-1491.
- Jensen, B.C., Sivam, D., Kifer, C.T., Myler, P.J. and Parsons, M. (2009). Widespread variation in transcript abundance within and across developmental stages of *Trypanosoma brucei*. *BMC Genomics* **10**, 482.
- Jokiranta, T.S., Jokipii, L. and Meri, S. (1995). Complement resistance of parasites. *Scand J Immunol* **42**, 9-20.
- Joshi, P.B., Kelly, B.L., Kamhawi, S., Sacks, D.L. and McMaster, W.R. (2002). Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol Biochem Parasitol* **120**, 33-40.
- Kabani, S., Fenn, K., Ross, A., Ivens, A., Smith, T.K., Ghazal, P. and Matthews, K. (2009). Genome-wide expression profiling of in vivo-derived bloodstream parasite stages and dynamic analysis of mRNA alterations during synchronous differentiation in *Trypanosoma brucei*. *BMC Genomics* **10**, 427.
- Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* **22**, 439-445.

- Kandil, E., Kohda, K., Ishibashi, T., Tanaka, K. and Kasahara, M. (1997). PA28 subunits of the mouse proteasome: primary structures and chromosomal localization of the genes. *Immunogenetics* **46**, 337-344.
- Kanemori, M., Yanagi, H. and Yura, T. (1999). The ATP-dependent HslVU/ClpQY protease participates in turnover of cell division inhibitor SulA in Escherichia coli. *J Bacteriol* **181**, 3674-3680.
- Kanmogne, G.D., Bailey, M. and Gibson, W.C. (1997). Wide variation in DNA content among isolates of Trypanosoma brucei ssp. *Acta Trop* **63**, 75-87.
- Kennedy, P.G. (2008). The continuing problem of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Ann Neurol* **64**, 116-126.
- Kessel, M., Maurizi, M.R., Kim, B., Kocsis, E., Trus, B.L., Singh, S.K. and Steven, A.C. (1995). Homology in structural organization between E. coli ClpAP protease and the eukaryotic 26 S proteasome. *J Mol Biol* **250**, 587-594.
- Killick-Kendrick, R., Molyneux, D.H. and Ashford, R.W. (1974). Leishmania in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **187**, 409-419.
- Kimura, Y., Saeki, Y., Yokosawa, H., Polevoda, B., Sherman, F. and Hirano, H. (2003) N-Terminal modifications of the 19S regulatory particle subunits of the yeast proteasome. In *Arch Biochem Biophys*. United States, pp. 341-348.
- Kinghorn, A. and York, W. (1912) One the Transmission of Human Trypanosomes by Glossina morsitans and on the Occurrence of Human Trypanosomes in Game. In *Ann Trop Med Parasitol*. pp. 1-23.
- Kirschner, M. (1999). Intracellular proteolysis. *Trends Cell Biol* **9**, M42-45.
- Kisselev, A.F., Akopian, T.N. and Goldberg, A.L. (1998). Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J Biol Chem* **273**, 1982-1989.
- Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Woo, K.M. and Goldberg, A.L. (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* **274**, 3363-3371.
- Kloetzel, P.M. (2004). Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* **5**, 661-669.
- Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J.P., Gannon, J. and Hunt, T. (1992). Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell* **3**, 1279-1294.
- Kohl, L. and Bastin, P. (2005). The flagellum of trypanosomes. *Int Rev Cytol* **244**, 227-285.
- Kohl, L., Robinson, D. and Bastin, P. (2003). [The flagellum: from cell motility to morphogenesis]. *J Soc Biol* **197**, 379-387.
- Kohl, L., Sherwin, T. and Gull, K. (1999). Assembly of the paraflagellar rod and the flagellum attachment zone complex during the Trypanosoma brucei cell cycle. *J Eukaryot Microbiol* **46**, 105-109.
- Koulich, E., Li, X. and DeMartino, G.N. (2008) Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome. In *Mol Biol Cell*. United States, pp. 1072-1082.
- Kroh, H.E. and Simon, L.D. (1990). The ClpP component of Clp protease is the sigma 32-dependent heat shock protein F21.5. *J Bacteriol* **172**, 6026-6034.
- Kruger, E., Witt, E., Ohlmeier, S., Hanschke, R. and Hecker, M. (2000). The clp proteases of Bacillus subtilis are directly involved in degradation of misfolded proteins. *J Bacteriol* **182**, 3259-3265.

- Kwon, A.R., Trame, C.B. and McKay, D.B. (2004). Kinetics of protein substrate degradation by HsIUUV. *J Struct Biol* **146**, 141-147.
- LaCount, D.J., Barrett, B. and Donelson, J.E. (2002). Trypanosoma brucei FLA1 is required for flagellum attachment and cytokinesis. *J Biol Chem* **277**, 17580-17588.
- Landfear, S.M. (2001). Molecular genetics of nucleoside transporters in Leishmania and African trypanosomes. *Biochem Pharmacol* **62**, 149-155.
- Landfear, S.M. and Ignatushchenko, M. (2001). The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* **115**, 1-17.
- Laskay, T., van Zandbergen, G. and Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other. *Trends Microbiol* **11**, 210-214.
- Laskay, T., van Zandbergen, G. and Solbach, W. (2008). Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular. *Immunobiology* **213**, 183-191.
- LeBowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L. and Beverley, S.M. (1993). Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in Leishmania. *Genes Dev* **7**, 996-1007.
- Leon, W., Fouts, D.L. and Manning, J. (1978). Sequence arrangement of the 16S and 26S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellate Leishmania donovani. *Nucleic Acids Res* **5**, 491-504.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., *et al.* (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* **27**, 37-58.
- Lewis, D.J. (1971). Phlebotomid sandflies. *Bull World Health Organ* **44**, 535-551.
- Li, Z., Lindsay, M.E., Motyka, S.A., Englund, P.T. and Wang, C.C. (2008). Identification of a bacterial-like HsIVU protease in the mitochondria of Trypanosoma brucei and its role in mitochondrial DNA replication. *PLoS Pathog* **4**, e1000048.
- Li, Z. and Wang, C.C. (2003). A PHO80-like cyclin and a B-type cyclin control the cell cycle of the procyclic form of Trypanosoma brucei. *J Biol Chem* **278**, 20652-20658.
- Li, Z., Zou, C.B., Yao, Y., Hoyt, M.A., McDonough, S., Mackey, Z.B., *et al.* (2002). An easily dissociated 26 S proteasome catalyzes an essential ubiquitin-mediated protein degradation pathway in Trypanosoma brucei. *J Biol Chem* **277**, 15486-15498.
- Lillico, S., Field, M.C., Blundell, P., Coombs, G.H. and Mottram, J.C. (2003). Essential roles for GPI-anchored proteins in African trypanosomes revealed using mutants deficient in GPI8. *Mol Biol Cell* **14**, 1182-1194.
- Lips, S., Revelard, P. and Pays, E. (1993). Identification of a new expression site-associated gene in the complete 30.5 kb sequence from the AnTat 1.3A variant surface protein gene expression site of Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol* **62**, 135-137.
- Liu, B., Liu, Y., Motyka, S.A., Agbo, E.E. and Englund, P.T. (2005a). Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends Parasitol* **21**, 363-369.
- Liu, B., Wang, J., Yaffe, N., Lindsay, M.E., Zhao, Z., Zick, A., *et al.* (2009). Trypanosomes have six mitochondrial DNA helicases with one controlling kinetoplast maxicircle replication. *Mol Cell* **35**, 490-501.
- Liu, C.W., Corboy, M.J., DeMartino, G.N. and Thomas, P.J. (2003). Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* **299**, 408-411.
- Liu, C.W., Strickland, E., Demartino, G.N. and Thomas, P.J. (2005b) Recognition and processing of misfolded proteins by PA700, the 19S regulatory complex of the 26S proteasome. In *Methods Mol Biol*. United States, pp. 71-81.
- Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. and Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon T. acidophilum at 3.4 Å resolution. *Science* **268**, 533-539.
- Lukes, J., Hashimi, H. and Zikova, A. (2005). Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr Genet* **48**, 277-299.

- Lumsden, W.H. and Evans, D.A. (1979) *Biology of the Kinetoplastida.*, Academic Press, pp. 738.
- Lupas, A., Flanagan, J.M., Tamura, T. and Baumeister, W. (1997). Self-compartmentalizing proteases. *Trends Biochem Sci* **22**, 399-404.
- Lupas, A.N. and Martin, J. (2002). AAA proteins. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 746-753.
- Ma, C.P., Slaughter, C.A. and DeMartino, G.N. (1992). Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain). *J Biol Chem* **267**, 10515-10523.
- Mani, A. and Gelmann, E.P. (2005). The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol* **23**, 4776-4789.
- Maslov, D.A., Podlipaev, S.A. and Lukes, J. (2001). Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **96**, 397-402.
- Maslov, D.A., Yasuhira, S. and Simpson, L. (1999). Phylogenetic affinities of Diplonema within the Euglenozoa as inferred from the SSU rRNA gene and partial COI protein sequences. *Protist* **150**, 33-42.
- Masson, P., Lundgren, J. and Young, P. (2003) Drosophila proteasome regulator REGgamma: transcriptional activation by DNA replication-related factor DREF and evidence for a role in cell cycle progression. In *J Mol Biol.* England, pp. 1001-1012.
- Matthews, K.R., Ellis, J.R. and Paterou, A. (2004). Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes. *Trends Parasitol* **20**, 40-47.
- Matthews, K.R. and Gull, K. (1994a). Cycles within cycles: the interplay between differentiation and cell division in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Today* **10**, 473-476.
- Matthews, K.R. and Gull, K. (1994b). Evidence for an interplay between cell cycle progression and the initiation of differentiation between life cycle forms of African trypanosomes. *J Cell Biol* **125**, 1147-1156.
- Matthews, K.R., Tschudi, C. and Ullu, E. (1994c). A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev* **8**, 491-501.
- Maupin-Furlow, J.A., Wilson, H.L., Kaczowka, S.J. and Ou, M.S. (2000). Proteasomes in the archaea: from structure to function. *Front Biosci* **5**, D837-865.
- McKean, P.G. (2003). Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *Curr Opin Microbiol* **6**, 600-607.
- McKean, P.G., Baines, A., Vaughan, S. and Gull, K. (2003). Gamma-tubulin functions in the nucleation of a discrete subset of microtubules in the eukaryotic flagellum. *Curr Biol* **13**, 598-602.
- Melville, S.E., Leech, V., Gerrard, C.S., Tait, A. and Blackwell, J.M. (1998). The molecular karyotype of the megabase chromosomes of *Trypanosoma brucei* and the assignment of chromosome markers. *Mol Biochem Parasitol* **94**, 155-173.
- Mifsud, K.R., Gutierrez-Mecinas, M., Trollope, A.F., Collins, A., Saunderson, E.A. and Reul, J.M. (2011). Epigenetic mechanisms in stress and adaptation. *Brain Behav Immun* **25**, 1305-1315.
- Minocha, N., Kumar, D., Rajanala, K. and Saha, S. (2011). Kinetoplast morphology and segregation pattern as a marker for cell cycle progression in *Leishmania donovani*. *J Eukaryot Microbiol* **58**, 249-253.
- Missiakas, D., Schwager, F., Betton, J.M., Georgopoulos, C. and Raina, S. (1996). Identification and characterization of HsIV HsIU (ClpQ ClpY) proteins involved in overall proteolysis of misfolded proteins in *Escherichia coli*. *Embo J* **15**, 6899-6909.

- Monnerat, S., Clucas, C., Brown, E., Mottram, J.C. and Hammarton, T.C. (2009). Searching for novel cell cycle regulators in *Trypanosoma brucei* with an RNA interference screen. *BMC Res Notes* **2**, 46.
- Murata, S., Kawahara, H., Tohma, S., Yamamoto, K., Kasahara, M., Nabeshima, Y., *et al.* (1999). Growth retardation in mice lacking the proteasome activator PA28gamma. *J Biol Chem* **274**, 38211-38215.
- Mutomba, M.C. and Wang, C.C. (1995). Differentiation of a culture-adapted mutant bloodstream form of *Trypanosoma brucei* into the procyclic form results in growth arrest of the cells. *Mol Biochem Parasitol* **72**, 215-225.
- Mutomba, M.C. and Wang, C.C. (1996). Effects of aphidicolin and hydroxyurea on the cell cycle and differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Mol Biochem Parasitol* **80**, 89-102.
- Mutomba, M.C. and Wang, C.C. (1998). The role of proteolysis during differentiation of *Trypanosoma brucei* from the bloodstream to the procyclic form. *Mol Biochem Parasitol* **93**, 11-22.
- Myler, P.J., Audleman, L., deVos, T., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., *et al.* (1999). *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2902-2906.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L. and Koonin, E.V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* **9**, 27-43.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K. and Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14687-14692.
- Ogbadoyi, E., Ersfeld, K., Robinson, D., Sherwin, T. and Gull, K. (2000). Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Chromosoma* **108**, 501-513.
- Ogura, T. and Wilkinson, A.J. (2001). AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells* **6**, 575-597.
- Olivier, M., Atayde, V.D., Isnard, A., Hassani, K. and Shio, M.T. (2012). *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect.*
- Opperdoes, F.R. (1984). Localization of the initial steps in alkoxyphospholipid biosynthesis in glycosomes (microbodies) of *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett* **169**, 35-39.
- Opperdoes, F.R. and Borst, P. (1977). Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett* **80**, 360-364.
- Orlowski, M. (1993). The multicatalytic proteinase complex (proteasome) and intracellular protein degradation: diverse functions of an intracellular particle. *J Lab Clin Med* **121**, 187-189.
- Orlowski, M., Cardozo, C., Hidalgo, M.C. and Michaud, C. (1991). Regulation of the peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing activity of the pituitary multicatalytic proteinase complex. *Biochemistry* **30**, 5999-6005.
- Ortega, J., Heymann, J.B., Kajava, A.V., Ustrell, V., Rechsteiner, M. and Steven, A.C. (2005). The axial channel of the 20S proteasome opens upon binding of the PA200 activator. In *J Mol Biol.* England, pp. 1221-1227.
- Ottosen, S., Herrera, F.J. and Triezenberg, S.J. (2002). Transcription. Proteasome parts at gene promoters. *Science* **296**, 479-481.
- Ouellette, M., Drummel-Smith, J. and Papadopoulou, B. (2004). *Leishmaniasis*: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* **7**, 257-266.

- Pagano, M., Tam, S.W., Theodoras, A.M., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., *et al.* (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* **269**, 682-685.
- Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L. and Maniatis, T. (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. In *Cell*. United States, pp. 773-785.
- Panigrahi, A.K., Ogata, Y., Zikova, A., Anupama, A., Dalley, R.A., Acestor, N., *et al.* (2009). A comprehensive analysis of *Trypanosoma brucei* mitochondrial proteome. *Proteomics* **9**, 434-450.
- Park, E., Rho, Y.M., Koh, O.J., Ahn, S.W., Seong, I.S., Song, J.J., *et al.* (2005). Role of the GYVG pore motif of HslU ATPase in protein unfolding and translocation for degradation by HslV peptidase. *J Biol Chem*.
- Parrot, L. and Donatien, A. (1927). Le parasite du bouton d'Orient chez le phlébotome. Infection naturelle et infection expérimentale de *Phlebotomus papatasi*. *Arch Inst Pasteur Algérie* **5**, 9-21.
- Parsons, M. (2004). Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Mol Microbiol* **53**, 717-724.
- Paugam, A., Bulteau, A.L., Dupouy-Camet, J., Creuzet, C. and Friguet, B. (2003) Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. In *Trends Parasitol*. England, pp. 55-59.
- Pays, E. and Nolan, D.P. (1998). Expression and function of surface proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **91**, 3-36.
- Peacock, C.S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J.C., Quail, M.A., *et al.* (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* **39**, 839-847.
- Peth, A., Uchiki, T. and Goldberg, A.L. (2010) ATP-dependent steps in the binding of ubiquitin conjugates to the 26S proteasome that commit to degradation. In *Mol Cell*. United States, 2010 Elsevier Inc, pp. 671-681.
- Phelouzat, M.A., Basselin, M., Lawrence, F. and Robert-Gero, M. (1995). Sinefungin shares AdoMet-uptake system to enter *Leishmania donovani* promastigotes. *Biochem J* **305** (Pt 1), 133-137.
- Pickart, C.M. and Cohen, R.E. (2004) Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. In *Nat Rev Mol Cell Biol*. England, pp. 177-187.
- Pines, J. and Hunter, T. (1990). Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* **346**, 760-763.
- Ploubidou, A., Robinson, D.R., Docherty, R.C., Ogbadoyi, E.O. and Gull, K. (1999). Evidence for novel cell cycle checkpoints in trypanosomes: kinetoplast segregation and cytokinesis in the absence of mitosis. *J Cell Sci* **112** (Pt 24), 4641-4650.
- Pradel, L.C., Bonhivers, M., Landrein, N. and Robinson, D.R. (2006). NIMA-related kinase TbNRKC is involved in basal body separation in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* **119**, 1852-1863.
- Queiroz, R., Benz, C., Fellenberg, K., Hoheisel, J.D. and Clayton, C. (2009). Transcriptome analysis of differentiating trypanosomes reveals the existence of multiple post-transcriptional regulons. *BMC Genomics* **10**, 495.
- Ralston, K.S., Lerner, A.G., Diener, D.R. and Hill, K.L. (2006). Flagellar motility contributes to cytokinesis in *Trypanosoma brucei* and is modulated by an evolutionarily conserved dynein regulatory system. *Eukaryot Cell* **5**, 696-711.
- Ramachandran, R., Hartmann, C., Song, H.K., Huber, R. and Bochtler, M. (2002). Functional interactions of HslV (ClpQ) with the ATPase HslU (ClpY). *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7396-7401.

- Ramasamy, G., Gupta, D., Mohammed, A. and Chauhan, V.S. (2007) Characterization and localization of Plasmodium falciparum homolog of prokaryotic ClpQ/HslV protease. In *Mol Biochem Parasitol*. Netherlands, pp. 139-148.
- Rathore, S., Jain, S., Sinha, D., Gupta, M., Asad, M., Srivastava, A., *et al.* (2011). Disruption of a mitochondrial protease machinery in Plasmodium falciparum is an intrinsic signal for parasite cell death. *Cell Death Dis* **2**, e231.
- Rechsteiner, M. and Hill, C.P. (2005) Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. In *Trends Cell Biol*. England, pp. 27-33.
- Rechsteiner, M., Realini, C. and Ustrell, V. (2000). The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem J* **345 Pt 1**, 1-15.
- Redmond, S., Vadivelu, J. and Field, M.C. (2003). RNAit: an automated web-based tool for the selection of RNAi targets in Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol* **128**, 115-118.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P. and Perieres, J. (1990). Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* **65**, 111-125.
- Robertson, C.D. (1999). The Leishmania mexicana proteasome. *Mol Biochem Parasitol* **103**, 49-60.
- Robinson, D.R. and Gull, K. (1991). Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. *Nature* **352**, 731-733.
- Robinson, D.R. and Gull, K. (1994). The configuration of DNA replication sites within the Trypanosoma brucei kinetoplast. *J Cell Biol* **126**, 641-648.
- Robinson, D.R., Sherwin, T., Ploubidou, A., Byard, E.H. and Gull, K. (1995). Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. *J Cell Biol* **128**, 1163-1172.
- Robinson, N.P., Burman, N., Melville, S.E. and Barry, J.D. (1999). Predominance of duplicative VSG gene conversion in antigenic variation in African trypanosomes. *Mol Cell Biol* **19**, 5839-5846.
- Rogers, M.E., Chance, M.L. and Bates, P.A. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of Leishmania mexicana by the sandfly Lutzomyia longipalpis. *Parasitology* **124**, 495-507.
- Rohrwild, M., Coux, O., Huang, H.C., Moerschell, R.P., Yoo, S.J., Seol, J.H., *et al.* (1996). HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in Escherichia coli related to the eukaryotic proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5808-5813.
- Rohrwild, M., Pfeifer, G., Santarius, U., Muller, S.A., Huang, H.C., Engel, A., *et al.* (1997). The ATP-dependent HslVU protease from Escherichia coli is a four-ring structure resembling the proteasome. *Nat Struct Biol* **4**, 133-139.
- Rudenko, G., Chaves, I., Dirks-Mulder, A. and Borst, P. (1998). Selection for activation of a new variant surface glycoprotein gene expression site in Trypanosoma brucei can result in deletion of the old one. *Mol Biochem Parasitol* **95**, 97-109.
- Ruiz-Gonzalez, M.X. and Marin, I. (2006). Proteasome-related HslU and HslV genes typical of eubacteria are widespread in eukaryotes. *J Mol Evol* **63**, 504-512.
- Sacks, D. and Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* **55**, 453-483.
- Sacks, D.L., Modi, G., Rowton, E., Spath, G., Epstein, L., Turco, S.J. and Beverley, S.M. (2000). The role of phosphoglycans in Leishmania-sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 406-411.

- Sakata, E., Bohn, S., Mihalache, O., Kiss, P., Beck, F., Nagy, I., *et al.* (2012) Localization of the proteasomal ubiquitin receptors Rpn10 and Rpn13 by electron cryomicroscopy. In *Proc Natl Acad Sci U S A*. United States, pp. 1479-1484.
- Schmidt, M., Lupas, A.N. and Finley, D. (1999). Structure and mechanism of ATP-dependent proteases. *Curr Opin Chem Biol* **3**, 584-591.
- Scholey, J.M., Brust-Mascher, I. and Mogilner, A. (2003). Cell division. *Nature* **422**, 746-752.
- Schreiner, P., Chen, X., Husnjak, K., Randles, L., Zhang, N., Elsasser, S., *et al.* (2008) Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction. In *Nature*. England, pp. 548-552.
- Selvapandiyani, A., Debrabant, A., Duncan, R., Muller, J., Salotra, P., Sreenivas, G., *et al.* (2004). Centrin gene disruption impairs stage-specific basal body duplication and cell cycle progression in *Leishmania*. *J Biol Chem* **279**, 25703-25710.
- Selvapandiyani, A., Kumar, P., Morris, J.C., Salisbury, J.L., Wang, C.C. and Nakhasi, H.L. (2007). Centrin1 is required for organelle segregation and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biol Cell* **18**, 3290-3301.
- Seol, J.H., Yoo, S.J., Shin, D.H., Shim, Y.K., Kang, M.S., Goldberg, A.L. and Chung, C.H. (1997). The heat-shock protein HslVU from *Escherichia coli* is a protein-activated ATPase as well as an ATP-dependent proteinase. *Eur J Biochem* **247**, 1143-1150.
- Seong, I.S., Kang, M.S., Choi, M.K., Lee, J.W., Koh, O.J., Wang, J., *et al.* (2002). The C-terminal tails of HslU ATPase act as a molecular switch for activation of HslV peptidase. *J Biol Chem* **277**, 25976-25982.
- Seong, I.S., Oh, J.Y., Lee, J.W., Tanaka, K. and Chung, C.H. (2000). The HslU ATPase acts as a molecular chaperone in prevention of aggregation of SulA, an inhibitor of cell division in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **477**, 224-229.
- Seong, I.S., Oh, J.Y., Yoo, S.J., Seol, J.H. and Chung, C.H. (1999). ATP-dependent degradation of SulA, a cell division inhibitor, by the HslVU protease in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **456**, 211-214.
- Sergent, E., Sergent, E., Parrot, L., Donatien, A. and Beguet, M. (1921) Transmission du clou de Biskra par le phlébotome (*Phlebotomus papatasi* Scop.). In *C.R. Acad. Sci.* pp. 1030.
- Sharon, M., Taverner, T., Ambroggio, X.I., Deshaies, R.J. and Robinson, C.V. (2006) Structural organization of the 19S proteasome lid: insights from MS of intact complexes. In *PLoS Biol.* United States, pp. e267.
- Sheader, K., Vaughan, S., Minchin, J., Hughes, K., Gull, K. and Rudenko, G. (2005). Variant surface glycoprotein RNA interference triggers a precytokinesis cell cycle arrest in African trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8716-8721.
- Sherwin, T. and Gull, K. (1989). The cell division cycle of *Trypanosoma brucei brucei*: timing of event markers and cytoskeletal modulations. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **323**, 573-588.
- Shlomai, J. (2004). The structure and replication of kinetoplast DNA. *Curr Mol Med* **4**, 623-647.
- Silva-Jardim, I., Horta, M.F. and Ramalho-Pinto, F.J. (2004). The *Leishmania chagasi* proteasome: role in promastigotes growth and amastigotes survival within murine macrophages. *Acta Trop* **91**, 121-130.
- Simpson, L. (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol* **41**, 363-382.

- Smith, D.M., Chang, S.C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y. and Goldberg, A.L. (2007) Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. In *Mol Cell*. United States, pp. 731-744.
- Smith, D.M., Kafri, G., Cheng, Y., Ng, D., Walz, T. and Goldberg, A.L. (2005) ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins. In *Mol Cell*. United States, pp. 687-698.
- Sousa, M.C., Trame, C.B., Tsuruta, H., Wilbanks, S.M., Reddy, V.S. and McKay, D.B. (2000). Crystal and solution structures of an HslUV protease-chaperone complex. *Cell* **103**, 633-643.
- Stahlberg, H., Kutejova, E., Suda, K., Wolpensinger, B., Lustig, A., Schatz, G., *et al.* (1999). Mitochondrial Lon of *Saccharomyces cerevisiae* is a ring-shaped protease with seven flexible subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6787-6790.
- Stephens JWW, F.H. (1910) On the Peculiar Morphology of a Trypanosome from a Case of Sleeping Sickness and the Possibility of its being a New Species (*T. rhodesiense*). In *Proc R Soc Lond*. pp. 22-33.
- Sterkers, Y., Lachaud, L., Bourgeois, N., Crobu, L., Bastien, P. and Pages, M. (2012). Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*. *Mol Microbiol*.
- Sterkers, Y., Lachaud, L., Crobu, L., Bastien, P. and Pagès, M. (2011). FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*. *Cell Microbiol* **13**, 274-283.
- Subramaniam, C., Veazey, P., Redmond, S., Hayes-Sinclair, J., Chambers, E., Carrington, M., *et al.* (2006). Chromosome-wide analysis of gene function by RNA interference in the african trypanosome. *Eukaryot Cell* **5**, 1539-1549.
- Suzuki, C.K., Rep, M., van Dijl, J.M., Suda, K., Grivell, L.A. and Schatz, G. (1997). ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends Biochem Sci* **22**, 118-123.
- Tabor, C.W. and Tabor, H. (1984). Polyamines. *Annu Rev Biochem* **53**, 749-790.
- Tammana, T.V., Sahasrabudde, A.A., Bajpai, V.K. and Gupta, C.M. (2010). ADF/cofilin-driven actin dynamics in early events of *Leishmania* cell division. *J Cell Sci* **123**, 1894-1901.
- Tamura, T., Nagy, I., Lupas, A., Lottspeich, F., Cejka, Z., Schoofs, G., *et al.* (1995). The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. *Curr Biol* **5**, 766-774.
- Tanahashi, N., Yokota, K., Ahn, J.Y., Chung, C.H., Fujiwara, T., Takahashi, E., *et al.* (1997). Molecular properties of the proteasome activator PA28 family proteins and gamma-interferon regulation. *Genes Cells* **2**, 195-211.
- Tanaka, K., Ii, K., Ichihara, A., Waxman, L. and Goldberg, A.L. (1986). A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. I. Purification, enzymological properties, and tissue distribution. *J Biol Chem* **261**, 15197-15203.
- Tetley, L. and Vickerman, K. (1985). Differentiation in *Trypanosoma brucei*: host-parasite cell junctions and their persistence during acquisition of the variable antigen coat. *J Cell Sci* **74**, 1-19.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. and Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* **19**, 94-102.
- To, W.Y. and Wang, C.C. (1997) Identification and characterization of an activated 20S proteasome in *Trypanosoma brucei*. In *FEBS Lett*. Netherlands, pp. 253-262.
- Tschan, S., Kreidenweiss, A., Stierhof, Y.D., Sessler, N., Fendel, R. and Mordmüller, B. (2010) Mitochondrial localization of the threonine peptidase PfHslV, a ClpQ ortholog

- in *Plasmodium falciparum*. In *Int J Parasitol*. England, 2010 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd, pp. 1517-1523.
- Tu, X. and Wang, C.C. (2004). The involvement of two cdc2-related kinases (CRKs) in *Trypanosoma brucei* cell cycle regulation and the distinctive stage-specific phenotypes caused by CRK3 depletion. *J Biol Chem* **279**, 20519-20528.
- Tu, X. and Wang, C.C. (2005). Pairwise knockdowns of cdc2-related kinases (CRKs) in *Trypanosoma brucei* identified the CRKs for G1/S and G2/M transitions and demonstrated distinctive cytokinetic regulations between two developmental stages of the organism. *Eukaryot Cell* **4**, 755-764.
- Turner, C.M. and Barry, J.D. (1989). High frequency of antigenic variation in *Trypanosoma brucei rhodesiense* infections. *Parasitology* **99 Pt 1**, 67-75.
- Tyler, K.M., Matthews, K.R. and Gull, K. (2001). Anisomorphic cell division by African trypanosomes. *Protist* **152**, 367-378.
- Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tomisugi, Y., Tanaka, K., Yasuoka, N. and Tsukihara, T. (2002) The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. In *Structure*. United States, pp. 609-618.
- Ustrell, V., Hoffman, L., Pratt, G. and Rechsteiner, M. (2002). PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *EMBO J* **21**, 3516-3525.
- Vale, R.D. (2000). AAA proteins. Lords of the ring. *J Cell Biol* **150**, F13-19.
- Van Den Abbeele, J., Claes, Y., van Bockstaele, D., Le Ray, D. and Coosemans, M. (1999). *Trypanosoma brucei* spp. development in the tsetse fly: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. *Parasitology* **118 (Pt 5)**, 469-478.
- Van der Ploeg, L.H., Valerio, D., De Lange, T., Bernards, A., Borst, P. and Grosveld, F.G. (1982). An analysis of cosmid clones of nuclear DNA from *Trypanosoma brucei* shows that the genes for variant surface glycoproteins are clustered in the genome. *Nucleic Acids Res* **10**, 5905-5923.
- Van Hellemond, J.J., Neuville, P., Schwarz, R.T., Matthews, K.R. and Mottram, J.C. (2000). Isolation of *Trypanosoma brucei* CYC2 and CYC3 cyclin genes by rescue of a yeast G(1) cyclin mutant. Functional characterization of CYC2. *J Biol Chem* **275**, 8315-8323.
- van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., *et al.* (1996). The multiubiquitin-chain-binding protein Mcb1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol Cell Biol* **16**, 6020-6028.
- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W. and Laskay, T. (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into. *J Immunol* **173**, 6521-6525.
- Vickerman, K. (1969). The fine structure of *Trypanosoma congolense* in its bloodstream phase. *J Protozool* **16**, 54-69.
- Vickerman, K. (1985). Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br Med Bull* **41**, 105-114.
- Vickerman, K., Tetley, L., Hendry, K.A. and Turner, C.M. (1988). Biology of African trypanosomes in the tsetse fly. *Biol Cell* **64**, 109-119.
- Voges, D., Zwickl, P. and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**, 1015-1068.
- Volf, P., Hostomska, J. and Rohousova, I. (2008). Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. *Parasite* **15**, 237-243.
- Volker, C. and Lupas, A.N. (2002). Molecular evolution of proteasomes. *Curr Top Microbiol Immunol* **268**, 1-22.

- Wenzel, T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. and Baumeister, W. (1994). Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products. *FEBS Lett* **349**, 205-209.
- Wheeler, R.J., Gluenz, E. and Gull, K. (2011). The cell cycle of Leishmania: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol Microbiol* **79**, 647-662.
- Wickner, S., Maurizi, M.R. and Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**, 1888-1893.
- Wiemer, E.A., L, I.J., van Roy, J., Wanders, R.J. and Opperdoes, F.R. (1996). Identification of 2-enoyl coenzyme A hydratase and NADP(+)-dependent 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity in glycosomes of procyclic Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol* **82**, 107-111.
- Wilk, S. and Orłowski, M. (1980). Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme. *J Neurochem* **35**, 1172-1182.
- Wilson, H.L., Ou, M.S., Aldrich, H.C. and Maupin-Furlow, J. (2000). Biochemical and physical properties of the Methanococcus jannaschii 20S proteasome and PAN, a homolog of the ATPase (Rpt) subunits of the eucaryal 26S proteasome. *J Bacteriol* **182**, 1680-1692.
- Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Jauffret, Y., Dedet, J.P. and Bastien, P. (1996). The Leishmania genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* **24**, 1688-1694.
- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C. and Cross, G.A. (1999). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol* **99**, 89-101.
- Wojcik, C. and DeMartino, G.N. (2003). Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 579-589.
- Woodward, R. and Gull, K. (1990). Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of Trypanosoma brucei. *J Cell Sci* **95 (Pt 1)**, 49-57.
- Yoo, S.J., Seol, J.H., Kang, M.S. and Chung, C.H. (1996a). Poly-L-lysine activates both peptide and ATP hydrolysis by the ATP-dependent HslVU protease in Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Commun* **229**, 531-535.
- Yoo, S.J., Seol, J.H., Seong, I.S., Kang, M.S. and Chung, C.H. (1997a). ATP binding, but not its hydrolysis, is required for assembly and proteolytic activity of the HslVU protease in Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Commun* **238**, 581-585.
- Yoo, S.J., Seol, J.H., Shin, D.H., Rohrwild, M., Kang, M.S., Tanaka, K., *et al.* (1996b). Purification and characterization of the heat shock proteins HslV and HslU that form a new ATP-dependent protease in Escherichia coli. *J Biol Chem* **271**, 14035-14040.
- Yoo, S.J., Shim, Y.K., Seong, I.S., Seol, J.H., Kang, M.S. and Chung, C.H. (1997b). Mutagenesis of two N-terminal Thr and five Ser residues in HslV, the proteolytic component of the ATP-dependent HslVU protease. *FEBS Lett* **412**, 57-60.
- Zhang, X., Cui, J., Nilsson, D., Gunasekera, K., Chanfon, A., Song, X., *et al.* (2010). The Trypanosoma brucei MitoCarta and its regulation and splicing pattern during development. *Nucleic Acids Res* **38**, 7378-7387.
- Zhang, X., Stoffels, K., Wurzbacher, S., Schoofs, G., Pfeifer, G., Banerjee, T., *et al.* (2004). The N-terminal coiled coil of the Rhodococcus erythropolis ARC AAA ATPase is neither necessary for oligomerization nor nucleotide hydrolysis. *J Struct Biol* **146**, 155-165.
- Zwickl, P. and Baumeister, W. (1999). AAA-ATPases at the crossroads of protein life and death. *Nat Cell Biol* **1**, E97-98.

Exploration fonctionnelle de protéines mitochondriales et étude du protéasome 'mitochondrial' HslVU, cible thérapeutique potentielle, chez les Trypanosomatidés.

Les Trypanosomatidés, dont les génomes ont été entièrement séquencés, présentent de nombreuses originalités dans leur biologie cellulaire et moléculaire, par exemple un ADN mitochondrial unique et extrêmement complexe appelé kinétoplaste. Leur développement suit également un "double" cycle cellulaire répliquant, d'une part, classiquement le noyau et, d'autre part, l'ensemble "corps basal-ADN mitochondrial" dont la ségrégation correcte conditionne la cytotéière. Ils possèdent par ailleurs deux types de protéasomes, un classique (26S) et un de type procaryote, plus spécifique et absent chez l'homme, le complexe HslVU. Nous avons montré que HslVU est localisé exclusivement dans l'unique mitochondrie des parasites, et qu'il est, chez *T. brucei*, essentiel pour la survie de ces organismes. En effet, son inhibition par ARN interférence entraîne un blocage de la cytotéière suivi par une mort cellulaire. Le premier objectif de cette thèse a été de tenter de mieux comprendre le rôle de HslVU dans le cycle cellulaire associé au kinétoplaste chez ces parasites possédant déjà un protéasome classique. Mettant un terme à plusieurs publications contradictoires, nous avons confirmé la localisation mitochondriale de ce complexe chez *Leishmania* et chez *T. brucei*. Nous montrons pour la première fois qu'il est tout aussi essentiel dans les formes sanguines, celles présentes chez l'hôte mammifère, que dans les formes procycliques. Nous montrons aussi un rôle différencié des différentes sous-unités du complexe dans le déroulement du cycle cellulaire associé au kinétoplaste.

Le deuxième objectif de cette thèse a été d'identifier de nouvelles protéines mitochondriales régulatrices du cycle cellulaire associé au kinétoplaste. Pour ce faire, nous avons développé une approche de criblage par ARN interférence "semi-systématique" sur 104 protéines mitochondriales, principalement de fonction inconnue. Si l'inhibition de l'expression de la majorité de ces protéines (62) n'a aucun effet sur la croissance cellulaire, celle des 42 restantes induit une baisse moyenne ou sévère de cette croissance. De façon surprenante, cette inhibition modifie significativement et avec plus ou moins d'ampleur le déroulement du cycle cellulaire, suggérant qu'il est dépendant de multiples fonctions cellulaires.

Enfin, ce travail valide le protéasome HslVU comme une cible thérapeutique pertinente tout particulièrement à l'adresse des formes sanguines de *T. brucei*. La différenciation fonctionnelle de HslU1 et HslU2 et l'activité indépendante de HslV donnent une image plus complexe sur le fonctionnement de ce protéasome. Les données d'ARN interférence pour leur part nous orientent vers une régulation du cycle cellulaire très intégrée à l'ensemble des activités cellulaires.

Mots-clés : *Leishmania*, *Trypanosoma brucei*, 'protéasome' HslVU, mitochondrie, ARN interférence, cycle cellulaire.

Functional study of mitochondrial proteins and of the 'mitochondrial' proteasome HslVU, a potential drug target, in Trypanosomatids.

Trypanosomatids, of which the genome has been entirely sequenced, exhibit numerous peculiarities in their cell and molecular biology, for example a single and complex mitochondrial DNA network termed kinetoplast. Also, their development follows a 'double' cell cycle ensuring the replication of, on the one hand, the nucleus (classical mitosis) and on the other hand, the "basal body-kinetoplast" whole, of which the correct segregation conditions cytokinesis. They also possess two types of proteasomes, one classical one (26S) and one of the prokaryotic type, more specific and absent in human, the HslVU complex. We have shown that HslVU is located exclusively in the single mitochondrion of these parasites and, in *T. brucei*, that it is essential to parasite's survival. Indeed, its RNA interference-based knockdown leads to a cytokinesis block followed by cell death. The first aim of this work was to try to better understand the role of HslVU in the 'kinetoplast-associated' cell cycle in these parasites that already possess a classical proteasome. Putting an end to several contradictory publications, we confirmed the mitochondrial location of this complex in *Leishmania* and *T. brucei*. For the first time, we also demonstrate that it is just as essential in bloodstream forms (those present in the mammalian host) than in procyclic forms. We finally show a differentiated role for the different subunits of the complex in the progress of the kinetoplast-associated cell cycle.

The second aim of this work was to identify novel mitochondrial proteins which would participate in the regulation of the kinetoplast-associated cell cycle. To do this, we developed a 'semi-systematic' screening approach using RNA interference for 104 mitochondrial proteins, most of them being of unknown function. If the inhibition of most of these proteins (64) had no effect on cell growth, that of the 42 remaining ones induced a moderate or severe growth defect. Surprisingly, this inhibition yielded significant and more or less visible modifications of the cell cycle progress, suggesting that the latter is dependent upon multiple cell functions.

Finally, this study validates the HslVU proteasome as a pertinent drug target, particularly for the bloodstream forms of *T. brucei*. The functional differentiation of HslU1 and HslU2 and the independent activity of HslV are intriguing and give a complex picture of the functioning of this proteasome. On the other hand, the RNA interference data suggest a cell cycle regulation which would be highly integrated to the whole of the cell activities.

Keywords : *Leishmania*, *Trypanosoma brucei*, HslVU 'proteasome', mitochondrion, RNA interference, cell cycle.

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, UFR Médecine, Université Montpellier 1, MIVEGEC UMR CNRS 5290 - CHU Site Antonin BALMES - 39, avenue Charles FLAHAULT - 34295 Montpellier Cedex 5. Tél : 0467635513