

MARIE-NOËLLE CHOU

**CARACTÉRISATION DU COMPLEXE PROTÉIQUE
eIF2 α IMPLIQUÉ DANS LA RÉGULATION DE
L'INITIATION DE LA TRADUCTION CHEZ LE
PARASITE PROTOZOAIRE *LEISHMANIA***

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

JUILLET 2005

Résumé

Leishmania est un parasite protozoaire dimorphique causant la leishmaniose à travers le monde. Puisque aucune régulation transcriptionnelle n'a été décrite chez ce parasite, l'étude de la régulation de la traduction est devenue essentielle. Il a été décrit chez les eucaryotes supérieurs que le facteur d'initiation de la traduction, eIF2 α , lorsqu'il est phosphorylé en condition de stress, est capable d'inhiber la traduction.

Les objectifs de ce travail étaient de 1) déterminer si le facteur eIF2 α est phosphorylé chez *Leishmania* au cours de la différenciation ou à la suite de certains stress et 2) de caractériser une des eIF2 α kinases, la PKR. Cette kinase est activée, entre autres par la présence d'ARN double brins et s'autophosphoryle. Par des expériences d'immunoprécipitation, de précipitation à l'aide d'ARNdb et d'immunobuvardage, il semble que, dans les deux cas (le facteur eIF2 α et la kinase PKR), soit majoritairement phosphorylés au stade amastigote intracellulaire du parasite. Les stress de pH et de température, qui mimiqueraient l'environnement du macrophage, et de la drogue thapsigargine, qui induit un stress du RE, ne semblent pas affecter l'expression de ces facteurs mais auraient un effet sur leur phosphorylation. De plus, ces protéines sont aussi associées particulièrement aux monosomes suggérant un rôle dans l'initiation de la traduction.

Avant-Propos

Avant même de poursuivre, je tiens à souligner la contribution de plusieurs personnes, sans qui la réalisation de ce mémoire n'aurait été possible. Tout d'abord, je voudrais remercier ma directrice de recherche, docteure Barbara Papadopoulou, pour m'avoir accepté dans son laboratoire et donner cette chance de passer deux ans dans un milieu aussi enrichissant. Son savoir et sa détermination sont des qualités inestimables.

Il ne faut certainement pas oublier tous les membres de cette merveilleuse équipe; Carole qui s'occupe de tant de choses pour nous tous, Marie qui a réponse à toutes mes questions, François qui est une source de motivation, Annie pour ses explications dans les programmes informatiques (MEIJE) ainsi que ses nombreux « lifts », Serge pour ses considérables solutions « communes », Michie pour sa bonne humeur, Conan pour ses conseils et sa générosité, Nathalie pour son expérience et ses importants recommandations en protéomique sans oublier Maria-Teresa qui est un exemple de constance.

Je m'en voudrais d'oublier une personne qui ne travaille plus dans le laboratoire mais qui a une contribution tout aussi importante : Marthe. Je la remercie pour tout ce qu'elle m'a montré lors de mes débuts dans la recherche mais aussi pour sa patience. Il y a aussi Maxime, Aurora, Hamid et Martin qui furent de bons collègues de travail.

Je tiens aussi à remercier Docteur Antonis E. Koromilas ainsi que toute son équipe, particulièrement Dionissios Baltzis, pour avoir pris le temps de m'enseigner plusieurs expériences essentielles pour ma maîtrise et pour m'avoir donner énormément de conseils indispensables.

Finalement, je dois aussi remercier l'organisme CRSNG pour son soutien financier au cours de ma dernière année de maîtrise.

Un dernier mot (et non le moindre!) pour remercier toute ma famille et mes amis pour le support et l'encouragement tout au long de ma maîtrise.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| RÉSUMÉ | I |
| AVANT-PROPOS..... | II |
| TABLE DES MATIÈRES..... | III |
| LISTE DES TABLEAUX..... | V |
| LISTE DES FIGURES | VI |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS..... | VII |
| 1 INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 GÉNÉRALITÉS | 1 |
| 1.1.1 <i>Leishmaniose</i> | 1 |
| 1.1.2 <i>Épidémiologie</i> | 3 |
| 1.1.3 <i>Traitement</i> | 6 |
| 1.2 CYCLE CELLULAIRE | 7 |
| 1.2.1 <i>Stade promastigote</i> | 8 |
| 1.2.2 <i>Stade amastigote</i> | 9 |
| 1.2.3 <i>Culture axénique</i> | 10 |
| 1.3 CARACTÉRISTIQUES CONNUES CHEZ <i>LEISHMANIA</i> | 10 |
| 1.3.1 <i>Le génome</i> | 10 |
| 1.3.2 <i>Mécanismes de survie chez l'hôte vertébré</i> | 11 |
| 1.3.3 <i>Effet du stress de température et de pH</i> | 11 |
| 1.3.3.1 L'influence de la température | 12 |
| 1.3.3.2 L'influence du pH..... | 12 |
| 1.3.4 <i>Régulation génique</i> | 13 |
| 1.3.5 <i>Éléments conservés dans le 3'UTR des ARNm</i> | 14 |
| 1.4 RÉGULATION DE L'INITIATION DE LA TRADUCTION CHEZ LES EUCARYOTES SUPÉRIEURS | 15 |
| 1.4.1 <i>Initiation de la traduction</i> | 16 |
| 1.4.2 <i>La protéine PABP1</i> | 17 |
| 1.4.3 <i>Facteur d'initiation de la traduction eIF4E</i> | 18 |
| 1.4.4 <i>Facteur d'initiation de la traduction eIF2</i> | 20 |
| 1.4.5 <i>Les kinases de eIF2α</i> | 21 |
| 1.4.5.1 PERK | 22 |
| 1.4.5.2 PKR..... | 22 |
| 1.4.5.3 GCN2..... | 24 |
| 1.4.5.4 HRI..... | 25 |
| 1.5 OBJECTIFS..... | 25 |
| 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES..... | 26 |
| 2.1 CLONAGE DE eIF2 α | 26 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.2 | MUTAGENÈSE DIRIGÉE SUR eIF2 α | 26 |
| 2.3 | CULTURE CELLULAIRE ET TRANSFECTION | 27 |
| 2.4 | INDUCTION DE STRESS CHEZ LE PARASITE | 27 |
| 2.5 | PRODUCTION ET PURIFICATION DE eIF2 α RECOMBINANT | 27 |
| 2.6 | HYBRIDATION ET TRANSFERT DE TYPE NORTHERN | 28 |
| 2.7 | IMMUNOBUVARDAGE | 28 |
| 2.8 | GRADIENT DE SUCROSE ET PROFIL DE POLYRIBOSOMES | 29 |
| 2.9 | IMMUNOPRÉCIPITATION ET ESSAI KINASE | 29 |
| 2.10 | PRÉCIPITATION À L'AIDE D'ARNDB ET ESSAI KINASE | 30 |
| 2.11 | PRODUCTION D'UN ANTICORPS ANTI-eIF2 α CHEZ LA SOURIS | 30 |
| 3 | RÉSULTATS..... | 31 |
| 3.1 | LE FACTEUR eIF2 α | 31 |
| 3.1.1 | <i>Production de eIF2α recombinante chez E. coli</i> | 33 |
| 3.1.2 | <i>Expression de eIF2α chez le parasite</i> | 35 |
| 3.1.3 | <i>Le facteur eIF2α est associé aux sous unités 40S et 60S des ribosomes</i> | 37 |
| 3.1.4 | <i>Phosphorylation de eIF2α en condition de stress</i> | 38 |
| 3.2 | LA eIF2 α KINASE : PKR | 40 |
| 3.2.1 | <i>Leishmania possède plusieurs homologues de eIF2α kinases</i> | 40 |
| 3.2.2 | <i>Caractérisation de l'homologue de la kinase PKR chez Leishmania</i> | 41 |
| 3.2.3 | <i>Expression de l'homologue PKR chez Leishmania</i> | 44 |
| 3.2.4 | <i>L'association d'homologue de PKR avec les polysomes</i> | 45 |
| 3.2.5 | <i>L'homologue de PKR est phosphorylé spécifiquement au stade amastigote</i> | 47 |
| 4 | DISCUSSION ET PERSPECTIVES | 50 |
| 4.1 | LA PHOSPHORYLATION DE eIF2 α EN CONDITIONS DE STRESS CHEZ <i>LEISHMANIA</i> | 51 |
| 4.2 | UN HOMOLOGUE DE PKR PARTICULIER | 51 |
| 4.3 | INTERACTION POSSIBLE ENTRE PKR ET eIF2 α | 53 |
| 4.4 | PERSPECTIVES | 54 |
| 5 | BIBLIOGRAPHIE..... | 55 |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----------|
| Tableau 1. Distribution géographique des différentes espèces de <i>Leishmania</i> | 5 |
| Tableau 2. Différentes constructions avec eIF2α de <i>L. major</i>..... | 26 |
| Tableau 3. Homologues de eIF2α kinases chez <i>Leishmania</i> | 40 |
| Tableau 4. Homologues de PKR chez <i>Leishmania</i> | 42 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. Manifestations cliniques des différentes formes de leishmaniose | 3 |
| Figure 2. Distribution des différentes formes de leishmaniose à travers le monde | 4 |
| Figure 3. Distribution de la co-infection <i>Leishmania</i> /VIH..... | 5 |
| Figure 4. Cycle de vie du parasite <i>Leishmania</i> | 8 |
| Figure 5. <i>Leishmania</i> sous forme promastigote et amastigote | 9 |
| Figure 6. Maturation des transcrits chez <i>Leishmania</i> | 14 |
| Figure 7. Initiation de la traduction chez les eucaryotes..... | 17 |
| Figure 8. Les kinases de eIF2 α | 22 |
| Figure 9. Alignement de séquences entre le facteur eIF2 α de l'humain, de la souris ainsi que de <i>L. major</i> | 33 |
| Figure 10. Induction de la protéine recombinante eIF2 α | 34 |
| Figure 11. Protéine recombinante eIF2 α | 35 |
| Figure 12. Expression eIF2 α chez <i>Leishmania</i> | 36 |
| Figure 13. Association du facteur eIF2 α aux ribosomes à travers un gradient de sucrose..... | 38 |
| Figure 14. Niveau de phosphorylation de eIF2 α chez des parasites stressés | 39 |
| Figure 15. Les homologues potentiels de PKR chez <i>Leishmania</i> | 41 |
| Figure 16. Alignement de l'homologue putatif de PKR de <i>Leishmania</i> avec le PKR murin..... | 43 |
| Figure 17. Domaines conservés entre le PKR de la souris et celui de <i>Leishmania</i> | 44 |
| Figure 18. Expression de l'homologue de PKR..... | 45 |
| Figure 19. PKR et son association aux ribosomes..... | 46 |
| Figure 20. Phosphorylation de l'homologue de PKR dans différentes conditions de stress..... | 48 |
| Figure 21. Liaison de PKR à l'ARNdb | 49 |

Liste des abréviations

| | |
|------------------|---|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARN _m | ARN messenger |
| ARN _t | ARN de transfert |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| °C | Degré Celsius |
| Chr | Chromosome |
| CO ₂ | Gaz carbonique |
| eIF | Facteur d'initiation de la traduction eucaryotique (Eukaryotic Translation Initiation Factor) |
| FBS | Sérum fœtal de bovin (Foetal Bovin Serum) |
| GC | Nucléotide guanine et cytosine |
| GTP | Guanidine triphosphate |
| IL | Interleukine |
| mA | Milliampère |
| MAA | Milieu pour amastigotes axéniques (Medium for Axenically Grown Amastigotes) |
| Met | Méthionine |
| Mb | Mégabase |
| ORF | Cadre de lecture ouvert (Open Reading Frame) |
| PAGE | Gel de polyacrylamide (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) |
| PBS | Solution saline de phosphate (Phosphate Buffered Saline) |
| PCR | Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction) |
| pH | Potentiel d'ions H ⁺ |
| T _H 1 | Lymphocyte T auxiliaire |
| RE | Réticulum endoplasmique |
| RPM | Rotation par minute |
| RT-PCR | PCR à transcription inverse (Reverse Transcription) |
| SDM | Milieu semi-défini (Semi-defined Medium) |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| μF | Microfarad |
| μM | Micromolaire |
| UTR | Région non traduite (Untranslated Region) |
| V | Volt |
| VIH | Virus de l'immunodéficience humaine |
| wt | Souche sauvage (Wild-type) |

1 Introduction

1.1 Généralités

Le parasite protozoaire du genre *Leishmania* fait parti de l'ordre des Kinetoplastidae et de la famille des Trypanosomatidae (Margulis *et al.*, 1996). Cet organisme unicellulaire a été identifié par Sir William Leishman en 1901 chez un soldat décédé de la fièvre de Dum-dum en Inde. L'ordre des Kinetoplastidae se caractérise par la présence d'une organelle unique; le kinétoplaste qui est situé à la position basale adjacente au flagelle (près de la poche flagellaire) et qui contient de l'ADN mitochondrial. Aucun cycle sexuel n'est connu chez le parasite, la multiplication se réalise par fission binaire, aussi appelée scissiparité. Ce parasite est qualifié de digénétique car il peut se retrouver chez un organisme invertébré qui sert de vecteur, la mouche des sables ou le phlébotome, ou chez les vertébrés, particulièrement les mammifères tels les humains, les rongeurs ou les chiens pour causer la leishmaniose. Au total, 21 espèces de *Leishmania* ont été dénombrées.

1.1.1 Leishmaniose

Le parasite *Leishmania* est endémique à travers le monde et cause la leishmaniose allant de la forme cutanée, mucocutanée à viscérale (aussi appelée Kala-azar). Cette dernière est létale si elle est non traitée. La leishmaniose est considérée comme l'une des six maladies tropicales majeures dans les pays en voie de développement selon l'organisation mondiale de la santé (OMS).

La forme cutanée de la leishmaniose peut être causée par *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana* ou *L. aethiopica* et constitue la forme la plus prévalente. Les manifestations cliniques diffèrent selon l'espèce et la région infectée. Elles varient de petites lésions à de larges ulcères de la peau localisés à l'endroit de la piqûre (voir Figure 1A). La guérison peut se faire d'elle-même à l'intérieur de quelques mois (*L. major*) ou de quelques années (*L. tropica*) tout en laissant de profondes cicatrices.

L. braziliensis et *L. peruviana* causent la forme mucocutanée de la leishmaniose. La maladie débute par un ulcère de la peau et se propage aux muqueuses de la bouche, du

pharynx et du nez. Les séquelles résultantes de cette infection consistent en une défiguration importante du malade (voir Figure 1B). Le processus débute par une première blessure qui apparaît sur la peau de une à quatre semaines après la piqûre et qui guérit généralement entre 6 et 15 mois après l'infection. La seconde lésion se déplace alors près du nez et de la bouche et cause une dégénération du cartilage et des tissus mous. À ce moment, une seconde infection d'origine bactérienne est fréquente. La mort peut survenir lors de la leishmaniose mucocutanée dans le cas où des complications dans le système respiratoire se produisent.

La forme viscérale de la leishmaniose, causée par *L. donovani*, *L. infantum* et *L. chagasi*, représente la forme la plus sévère car elle est létale si non traitée. Le taux de mortalité demeure non négligeable même sous traitement, allant de 5 à 15%. La période d'incubation de ce parasite varie de dix jours à un an, mais se range habituellement entre deux et quatre mois. Les parasites peuvent infecter les macrophages de la rate, du foie, de l'intestin et de la moelle osseuse lorsqu'ils ont pénétré l'organisme suite à une piqûre du vecteur. Les premiers symptômes sont surtout la fièvre, le vomissement et la diarrhée puis le foie et la rate augmentent de volume (hépatosplénomégalie) (voir Figure 1C). Après 6 à 12 mois, survient la mort souvent suite à une seconde infection opportuniste par un autre pathogène qui cause la tuberculose ou la pneumonie.

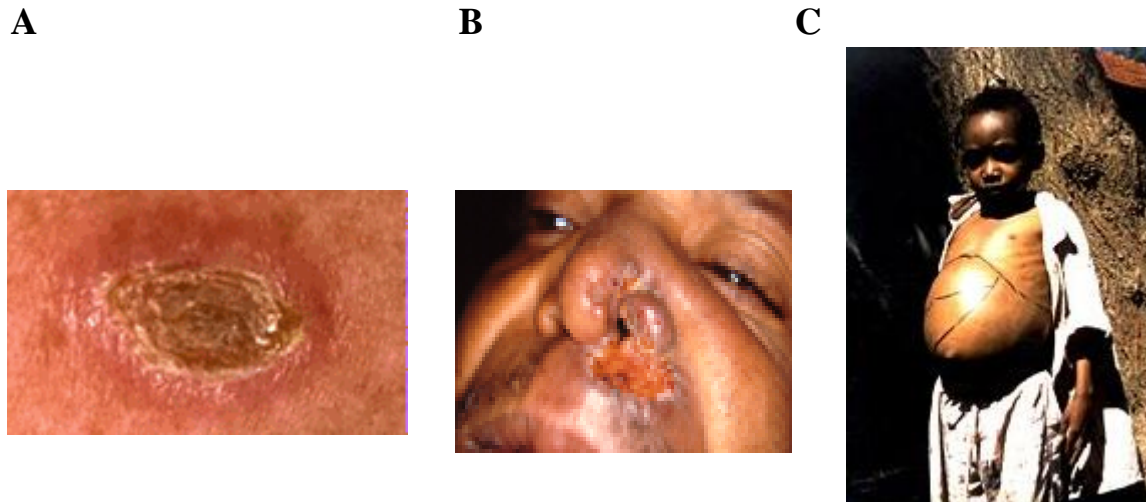


Figure 1. Manifestations cliniques des différentes formes de leishmaniose

(A) **Leishmaniose cutanée.** La forme cutanée de la leishmaniose cause des ulcères de la peau à l'endroit de la piqûre. (B) **Leishmaniose mucocutanée.** Un patient atteint de la leishmaniose mucocutanée subit une défiguration importante particulièrement au niveau des muqueuses. (C) **Leishmaniose viscérale.** L'hépatosplénomégalie est facilement observable chez les patients infectés par *L. donovani* suite à une infection de type leishmaniose viscérale. (source : www.who.int)

1.1.2 Épidémiologie

Près de 15 millions de cas de leishmaniose ont été rapportés dans 88 pays dont deux millions de nouveaux cas estimés par année. La Figure 2 présente la distribution géographique de ces cas selon la forme de leishmaniose contractée. Sur ce nombre, près d'un demi-million de personnes contracteraient la forme viscérale (Herwaldt, 1999). De plus, environ 400 millions de personnes sont sujettes à une infection par *Leishmania* due à leur situation géographique, économique ou physique. Dans les dernières années, le nombre de cas de co-infection avec le VIH-1 ne cesse aussi d'augmenter (voir Figure 3). Dans les dernières années, beaucoup de recherches se sont concentrées à comprendre les interactions entre les deux agents infectieux (Zhao *et al.*, 2004a; Zhao *et al.*, 2004b). Le tiers des cas de co-infections décède suite à l'infection par *Leishmania* causant la leishmaniose viscérale. La distribution géographique des différentes espèces de *Leishmania* s'apparente de très près à celle de l'insecte vecteur. Les régions les plus touchées sont l'Amérique de Sud, le bassin méditerranéen, le Moyen-Orient et l'Asie. Le Tableau 1 présente la distribution géographique de chaque espèce. Il existe plus de 600 espèces de mouche de sable dont environ 30 d'entre elles peuvent transporter le parasite soit ceux faisant parties des genres *Lutzomyia* dans le nouveau monde et *Phlebotomus* dans l'ancien monde. Ces insectes

préfèrent des plaines plates et en dessous de 600 mètres d'altitude. Le choix du vecteur selon l'espèce de *Leishmania* dépend de la spécificité de son lipophosphoglycan.

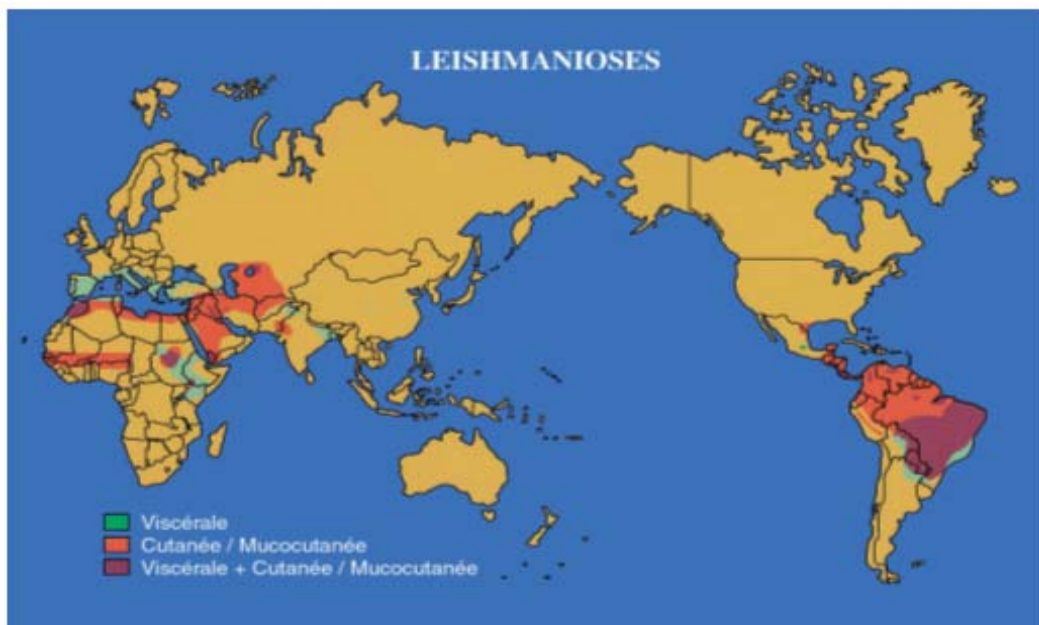


Figure 2. Distribution des différentes formes de leishmaniose à travers le monde

La leishmaniose se concentre surtout en Amérique du Sud, autour du bassin méditerranéen, en Afrique du Nord, au Moyen-Orient et en Inde. (source : Handman, 2001)

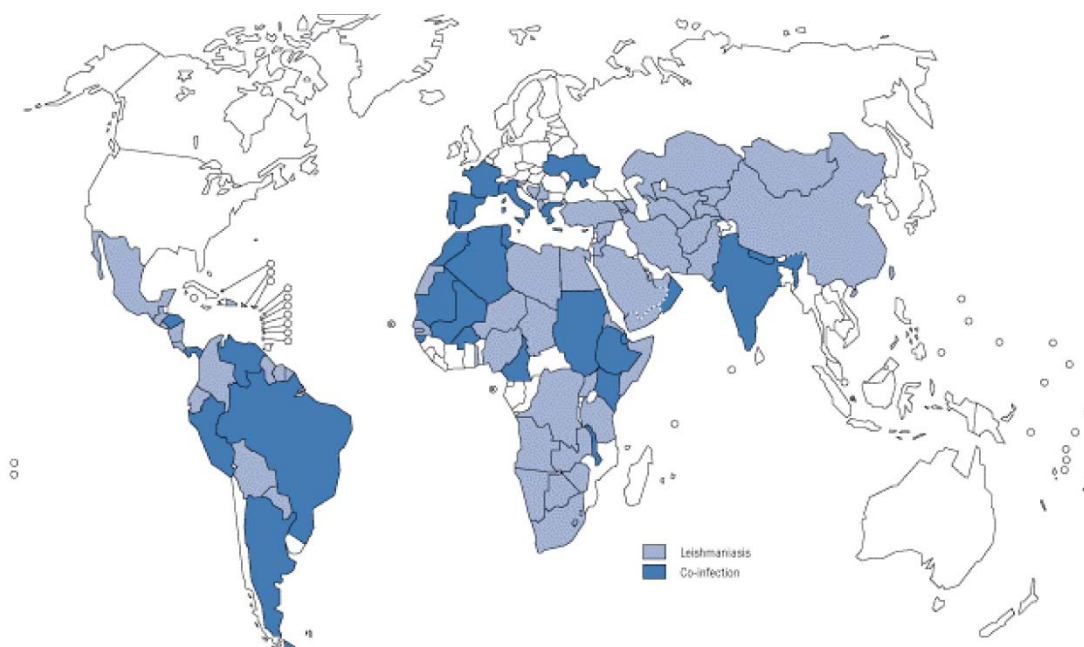


Figure 3. Distribution de la co-infection *Leishmania*/VIH

L'Amérique du Sud, le bassin méditerranéen, l'Afrique ainsi que l'Inde sont les régions les plus touchées par les cas de co-infection *Leishmania*/VIH. (source : www.who.int)

Tableau 1. Distribution géographique des différentes espèces de *Leishmania*

| Espèce | Distribution géographique |
|---------------------------------|----------------------------------|
| Leishmaniose cutanée | |
| <i>L. aethiopica</i> | Éthiopie et Kenya |
| <i>L. major</i> | L'Afrique et l'Asie |
| <i>L. mexicana</i> | Amérique Centrale et du Sud |
| <i>L. tropica</i> | Europe, Asie et Afrique du Nord |
| Leishmaniose mucocutanée | |
| <i>L. braziliensis</i> | Amérique Centrale et du Sud |
| <i>L. peruviana</i> | Amérique du Sud |
| Leishmaniose viscérale | |
| <i>L. chagasi</i> | Amérique du Sud |
| <i>L. donovani</i> | Afrique et Asie |
| <i>L. infantum</i> | Bassin méditerranéen |

1.1.3 Traitement

Les traitements les plus utilisés contre la leishmaniose encore aujourd'hui, et ce, depuis 1940 sont les drogues Pentostam et Glucantime dont le composé actif est l'antimoine pentavalent. Ce dernier remplace l'antimoine trivalent, la première drogue utilisée, qui fût très vite abandonnée dû à sa toxicité. La forme pentavalente de l'antimoine bien qu'elle guérisse un grand nombre de malades, comporte également de la toxicité, surtout au niveau rénal et cardiaque et énormément d'effets secondaires. La prise de médicaments s'échelonne de 20 à 28 jours et il doit être administré de manière intraveineuse ou intramusculaire dans le cas de la leishmaniose viscérale (Berman, 2003). L'efficacité est, en outre, faible surtout contre la forme mucocutanée de la maladie. De plus, la résistance à ce composé devient de plus en plus importante, particulièrement en Inde (Lira *et al.*, 1999).

Plusieurs autres composés sont maintenant disponibles sur le marché; l'amphotéricine B, la miltefosine, la pentamidine et la paramomycine. L'amphotéricine B peut être véhiculé par des particules de liposomes et semble avoir une bonne efficacité pour le traitement de la leishmaniose, même pour la forme cutanée et mucocutanée (Berman, 2003). Il s'attaquerait aux lipides, plus spécifiquement les stérols de la membrane plasmique du parasite de la même manière qu'il le fait pour les champignons. Par contre, ce produit est trop dispendieux pour être distribué dans tous les pays atteints de la leishmaniose, particulièrement dans les pays en voie de développement. La miltefosine est un agent oral plus récent dont l'efficacité semble importante comme l'indique le cas des patients indiens atteints de la leishmaniose viscérale. Par contre, la toxicité chez les enfants et les patients immunosupprimés est à considérer. Son mode d'action serait apparemment impliqué avec des changements dans la biosynthèse des phospholipides. La fluconazole, administrée de façon orale également, serait efficace et plutôt bien tolérée contre la leishmaniose cutanée causée par *L. major* (Alrajhi *et al.*, 2002; Ouellette *et al.*, 2004). La pentamidine interfère avec le mécanisme des polyamines mais doit être administrée à de faibles doses pour atténuer l'effet toxique. La paramomycine, quant à elle, est un agent antibactérien mais serait également active contre les protozoaires. Cet aminoglycoside inhibe les fonctions de la mitochondrie ainsi que celles des ribosomes. Certaines combinaisons de drogues sont aussi testées et donnent parfois des résultats plus encourageants.

Le phénomène de résistance divers aux traitements a atteint un point inquiétant; jusqu'à 70% des patients infectés en Inde ne répondent présentement pas aux traitements. Beaucoup reste à faire pour comprendre parfaitement les mécanismes régissant cette résistance (Ouellette *et al.*, 2004; Ouellette and Papadopoulou, 1993). Quelques preuves tendent à démontrer que le parasite augmente l'expression de gènes impliqués dans le contrôle des drogues par amplification génique ou par augmentation du niveau d'ARNm (Guimond *et al.*, 2003; Haimeur *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2001). La diminution d'entrée de la drogue, une plus forte capacité à l'expulsion de celle-ci ou l'altération du composé actif sont autant d'autres mécanismes possibles (Legare *et al.*, 2001a; Legare *et al.*, 2001b; Ouellette *et al.*, 2001).

Malheureusement, aucun vaccin efficace n'a été mis au point jusqu'à nos jours bien que beaucoup d'efforts continuent d'être fournis pour y arriver (Handman, 2001; Papadopoulou *et al.*, 1998). La chimiothérapie serait une voie d'avenir dans le traitement de cette infection, spécialement dans le cas de la leishmaniose mucocutanée (Croft and Coombs, 2003). L'immunomodulation constitue une autre voie pour le traitement de la leishmaniose. En effet, l'élimination du parasite *Leishmania* doit obligatoirement passer par une réponse immunitaire de type cellulaire médiée par les T_H1. Ainsi, la stimulation des macrophages par l'utilisation de cytokines de type T_H1 pourrait s'avérer efficace (Davis *et al.*, 2004; Dumas *et al.*, 2003). L'existence de milliers d'animaux pouvant servir de réservoir et la distribution étendue des mouches de sable rendent difficile l'extermination de ce parasite.

1.2 Cycle cellulaire

Leishmania se retrouve sous deux formes de développement; soit promastigote lorsqu'il est dans les glandes salivaires de l'insecte vecteur ou sous forme d'amastigote à l'intérieur des macrophages de l'hôte infecté (voir Figure 4). Cette transformation entraîne plusieurs changements physiques et métaboliques dus principalement aux changements de pH et de température. En premier lieu, le promastigote, mobile et flagellé, s'arrondit et perd son flagelle. De plus, l'expression de plusieurs gènes amastigote-spécifiques, par exemple, les gènes de la famille de l'amastine chez *Leishmania donovani infantum*, est induite dans ces conditions. La régulation post-transcriptionnelle occupe une place importante chez le

parasite car il n'y a pas de promoteur typique de l'ARN polymérase II (ARN pol II) connu et les gènes sont transcrits en polycistron puis maturés par épissage en *trans* et polyadénylés (voir la section 1.3.4 Régulation génique). Ainsi, l'étude de mécanismes de régulation traductionnelle chez ce parasite devient de plus en plus importante.

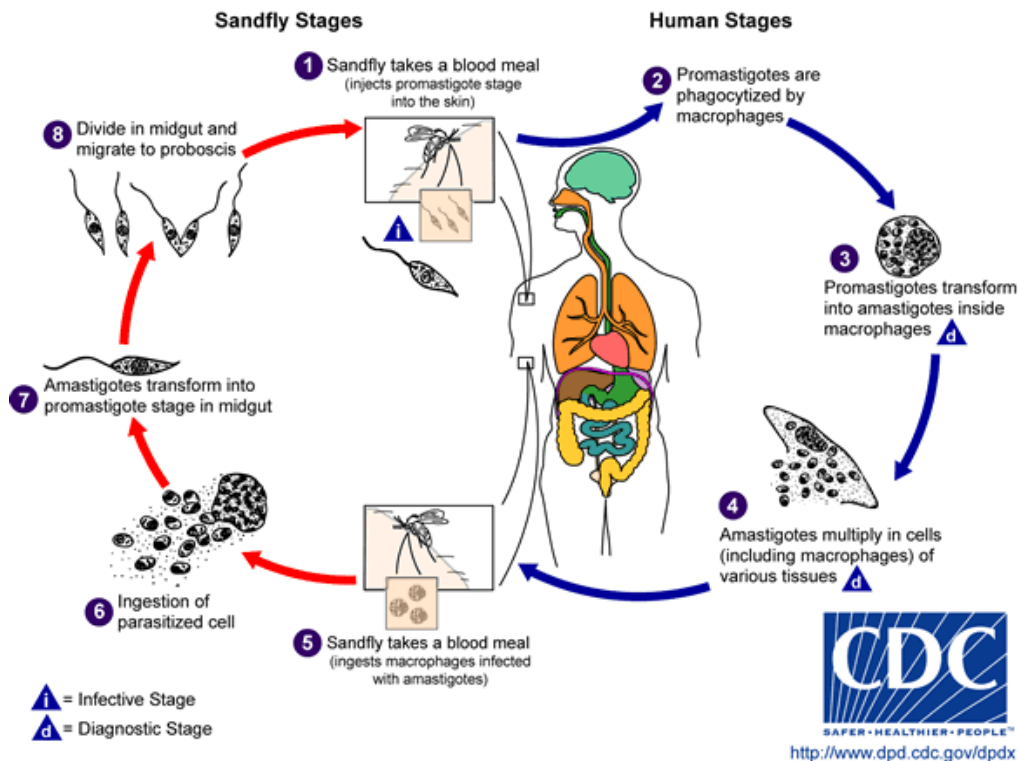


Figure 4. Cycle de vie du parasite *Leishmania*

Les promastigotes métacycliques présents chez l'insecte vecteur se différencient dans les macrophages de l'hôte sous la forme amastigote. Lors du prochain repas sanguin de la mouche des sables chez un individu infecté, les amastigotes se redifférencient en promastigotes chez l'insecte pour compléter le cycle de vie. (source : www.dpd.cdc.gov/dpdx)

1.2.1 Stade promastigote

Le parasite sous cette forme comprend un flagelle et il est mobile (voir Figure 5A). Selon l'espèce, la durée du cycle chez l'insecte dure de 4 à 18 jours. Un promastigote mesure entre 12 et 16 μm de long et 1,5 et 3,5 μm de large. Le flagelle mesure de 15 à 28 μm . Lorsque la mouche des sables prend un repas sanguin chez une personne infectée, elle ingère des amastigotes qui se différencieront en promastigotes chez l'insecte. Le stade promastigote peut se rediviser en quatre sous stades soit le nectomonade, haptomonade, paramastigote et métacyclique. Les trois premiers stades représentent le processus de métacyclogénèse où le parasite est en division active. La dernière forme représente celle qui

est infectieuse et se retrouve donc dans la cavité buccale de l'insecte. Il ne peut alors se diviser. Lors du prochain repas sanguin de l'insecte, le promastigote se transmettra à son hôte vertébré et se différenciera à nouveau en amastigote dans les macrophages (Killick-Kendrick, 1990).

1.2.2 Stade amastigote

La forme amastigote, ronde ou ovale, mesure entre 2,5 μm et 5,0 μm de large et de long selon l'espèce et ne possède pas de flagelle (voir Figure 5B). Les amastigotes se divisent à l'intérieur des phagolysosomes des macrophages de l'hôte infecté par fission binaire et peuvent aussi infecter d'autres monocytes et les cellules épithéliales. Les récepteurs du complément permettent aux promastigotes métacycliques de reconnaître les macrophages. Ces derniers ingèrent le parasite par endocytose à l'aide de ces récepteurs. Le changement de température de 25°C à 37°C dans le cas de *L. donovani* ou à 32°C-35°C pour *L. major* (Garlapati *et al.*, 1999) et le changement de pH, passant d'un pH physiologique à un pH aux environs de 5,0, induisent la différenciation en amastigotes. Plusieurs mécanismes peu connus permettent à l'amastigote de survivre dans ces conditions extrêmes (voir section 1.3.2 Mécanismes de survie chez l'hôte vertébré).

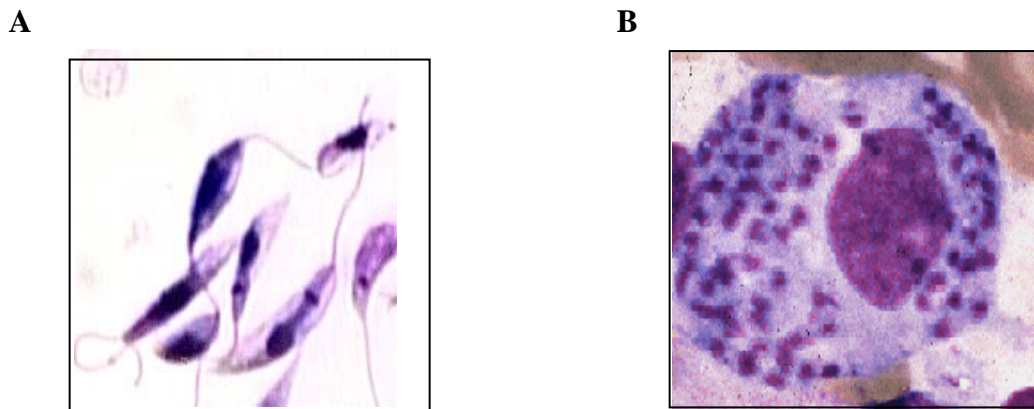


Figure 5. *Leishmania* sous forme promastigote et amastigote

(A) **Promastigotes.** Les promastigotes sont des parasites mobiles plus allongés et flagellés qui sont présents chez l'insecte vecteur. (B) **Amastigotes.** Les amastigotes situés à l'intérieur du macrophage sont arrondis ou ovales et de tailles plus petites. (source : www.who.int)

1.2.3 Culture axénique

Toutes les espèces de *Leishmania* peuvent croître en culture axénique sous leur forme promastigote. Par contre, la forme intracellulaire, les amastigotes, est beaucoup plus difficile à maintenir en conditions axéniques et très peu d'espèces en sont capables. Le parasite *L. donovani infantum* peut être cultivé en laboratoire de façon axénique en sa forme amastigote. La simulation du cycle de vie se réalise par le changement de milieu. Le milieu SDM-79, à un pH de 7.2, permet la croissance de promastigotes incubés à 25°C. Il suffit de transférer les promastigotes ayant atteints la phase stationnaire dans le milieu MAA à un pH d'environ 5.5 et de les incuber à 37°C et la différenciation de promastigotes en amastigotes se réalise à l'intérieur de 4-5 jours. Outre le changement de pH et de température, la composition du milieu diffère également. Cependant, dans les deux cas, le milieu doit subvenir au besoin du parasite en purines. En effet, *Leishmania* en est auxotrophe. Cette méthode de culture axénique a été démontrée comme mimant parfaitement les conditions *in vivo*, c'est-à-dire à l'intérieur du macrophage. Ces conditions sont très importantes pour la validation des résultats obtenus *in vitro* car le parasite subit de profonds changements morphologiques, biochimiques et métaboliques lors de sa différenciation (Saar *et al.*, 1998; Sereno and Lemesre, 1997).

1.3 Caractéristiques connues chez *Leishmania*

1.3.1 Le génome

Le génome haploïde de *Leishmania* comporte généralement 36 chromosomes, à l'exception de *L. braziliensis* et *L. mexicana* qui en contiennent 35 et 34, respectivement, pour un total de 34 Mb (Wincker *et al.*, 1996). Bien que ce nombre varie, l'organisation et l'ordre des gènes restent conservés entre les espèces, pathogènes ou non (Tamar *et al.*, 2000). La taille de chaque chromosome varie de 0,28 à 2,80 Mb. Le génome est riche en GC avec un taux de 64% et code pour environ 8300 gènes. Le séquençage du génome de *L. major* par l'Institut Sanger est maintenant terminé et celui de *L. donovani infantum* est en annotation (www.GeneDB.org).

1.3.2 Mécanismes de survie chez l'hôte vertébré

Le parasite a développé plusieurs mécanismes lui permettant de survivre dans un milieu aussi extrême qu'est le phagolysosome des macrophages (Cunningham, 2002). *Leishmania* exprime à sa surface cellulaire un lipophosphoglycan (LPG) unique et une métalloprotéase, gp63. D'abord, les promastigotes métacycliques inhibent les propriétés fusogéniques de la membrane avec leur LPG et empêchent la fusion du lysosome avec le phagosome. L'activité de plusieurs enzymes hydrolytiques est aussi altérée. Le LPG, encore une fois, agit en tant que barrière hydrolytique dû à sa nature hautement anionique. Il peut également chelater le calcium qui régule plusieurs fonctions cellulaires telle que la transduction de signaux (Descoteaux *et al.*, 1991). De plus, la gp63 peut dégrader les enzymes lysosomales (Cunningham, 2002). Les cascades signalétiques cellulaires sont aussi affectées car le parasite exprime des phosphatases qui agissent sur les protéines du macrophage. *Leishmania* semble, en plus, activer la phosphatase SHP-1 cellulaire qui déphosphoryle normalement les protéines impliquées dans la cascade de kinases JAK et MAP (Blanchette *et al.*, 1999). Les glycosylinoles phospholipides des amastigotes inhibent la production d'oxyde nitrique du macrophage servant à la réponse à plusieurs signaux extracellulaires, tandis que le LPG et le gp63 pourraient protéger le parasite de métabolites d'oxygène toxiques. La survie du parasite est aussi assurée par l'inhibition de la production de cytokines. En effet, les promastigotes et les amastigotes ont la capacité de diminuer la production d'IL-12 impliquée dans la réponse T_H1 . *Leishmania* se distingue d'autres parasites par le fait qu'il ne fait pas simplement se défendre à l'intérieur de l'hôte mais il agit activement en manipulant la réponse immune. De plus, certaines kinases sont excrétées par les promastigotes dans leur milieu et ces kinases ont conservé leur activité même à pH acide (Vieira *et al.*, 2002). Il va sans dire que ces enzymes doivent jouer un rôle important dans la survie intracellulaire pour que leur activité soit conservée dans une étendue de pH aussi large.

1.3.3 Effet du stress de température et de pH

La différenciation du parasite est principalement induite par les changements de température et de pH extracellulaire. En plus des changements morphologiques, ces stress amènent également plusieurs modifications métaboliques majeures conduisant à une

différenciation complète. Ceci démontre une habilité d'adaptation importante de la part du parasite.

1.3.3.1 L'influence de la température

La température rencontrée par *Leishmania* dans les macrophages diffère selon le site de l'infection (32°C à 37°C). La thermotolérance des souches causant la leishmaniose viscérale est plus grande que les autres souches. En effet, *L. donovani* résiste à un choc thermique de 39°C contrairement à *L. major*. Il a été démontré *in vivo* que l'infectivité augmente également lorsque les parasites subissent un choc thermique avant d'être inoculés chez l'animal (Zilberstein and Shapira, 1994). Ce stress peut à lui seul induire la plupart des changements morphologiques observables, bien que ce soit moins efficace dans les souches de *Leishmania* de l'ancien monde. Il est facile de comprendre que ce stress augmente la quantité de transcrits codant pour des gènes de la famille des hsp (heat shock protein), tels que hsp70 et hsp83 (Zilka *et al.*, 2001). Il existe plusieurs hsp70 chez *L. major* : deux seraient exprimées constitutivement et une est de façon différente entre la forme procyclique et métacyclique. L'élévation de température n'augmente pas la transcription des hsp mais stabiliserait plutôt les transcrits et cela conduirait à leur accumulation.

1.3.3.2 L'influence du pH

Il est étonnant de constater que le pH intracellulaire du parasite ne varie qu'entre 6.8 et 7.4 entre les deux stades tandis que celui extracellulaire passe de 7.5 à 4.5. Des expériences enzymatiques ont prouvé que le pH optimal pour plusieurs enzymes varie chez les deux stades du parasite (Zilberstein and Shapira, 1994). Par exemple, la protéine gp63 existe sous deux formes dont l'activité s'adapte au pH environnemental. Il a été aussi observé que le temps de génération des promastigotes diminue en fonction du pH. Une étude (Garlapati *et al.*, 1999) a effectivement montré que le pH acide contribue à la stabilisation du transcrit de hsp83 à 26°C. Par contre, aucune augmentation de la traduction n'a été observée contrairement au choc thermique (Argaman *et al.*, 1994).

1.3.4 Régulation génique

Compte tenu de l'absence des introns (ou presque) et d'un promoteur pour l'ARN pol II, les transcrits sont d'abord polycistroniques. Seul le promoteur du mini-exon est de type ARN pol II (Gilinger and Bellofatto, 2001). De plus, il semble que la polyadénylation de ce transcrit contribuerait à sa régulation stade-spécifique (Lamontagne and Papadopoulou, 1999). L'initiation de la transcription par l'ARN pol II reste encore un mystère. Il a été proposé que l'initiation se fait par hasard ou qu'il y a quelques promoteurs très distancés (Campbell *et al.*, 2003). Les transcrits du chromosome 1 et du chromosome 3 de *L. major Friedlin* ont été décrits en détails récemment (Martinez-Calvillo *et al.*, 2004; Martinez-Calvillo *et al.*, 2003). Le chromosome 1 contient deux larges unités polycistroniques situées sur les deux brins de l'ADN qui codent pour 29 et 50 gènes, respectivement. Leur transcription se fait en direction opposée l'une de l'autre. Un mini-exon de 39 nucléotides, essentiel à la viabilité cellulaire des Trypanosomatidae (Das and Bellofatto, 2003), s'ajoute ensuite à chaque transcrit en 5' et la queue de poly-A en 3' à la suite de l'épissage en *trans* (voir Figure 6) (Requena *et al.*, 2003). Le mini-exon contient une coiffe unique (nommée cap-4) qui s'ajoute automatiquement à chaque transcrit des Kinetoplastidae (Yoffe *et al.*, 2004). Cette coiffe, modifiée sur les quatre premiers nucléotides, contiendrait des éléments essentiels pour l'interaction ou la reconnaissance des ARNm avec le ribosome et pourrait aussi donner lieu à un mécanisme de traduction inconnu jusqu'à maintenant. Une équipe de Californie (Zeiner *et al.*, 2003) a fait des mutations sur différentes parties du mini-exon et il semblerait que la coiffe et la première partie du mini-exon jouerait ce rôle. Aucune régulation au niveau de la transcription n'a été décrit chez *Leishmania* (Clayton, 2002). Ainsi, le parasite aurait préconisé une régulation post-transcriptionnelle plus rapide et efficace. En effet, ce type de contrôle ne nécessite point de nouvelle synthèse d'ARNm incluant son épissage et son transport. La régulation traductionnelle et post-traductionnelle comporte aussi les avantages d'être réversible, comme la phosphorylation, d'avoir un meilleur ajustement de la quantité de protéines et de la possibilité d'un contrôle spatial (Mazumder *et al.*, 2003; Ouellette *et al.*, 2003; Papadopoulou *et al.*, 2003b).

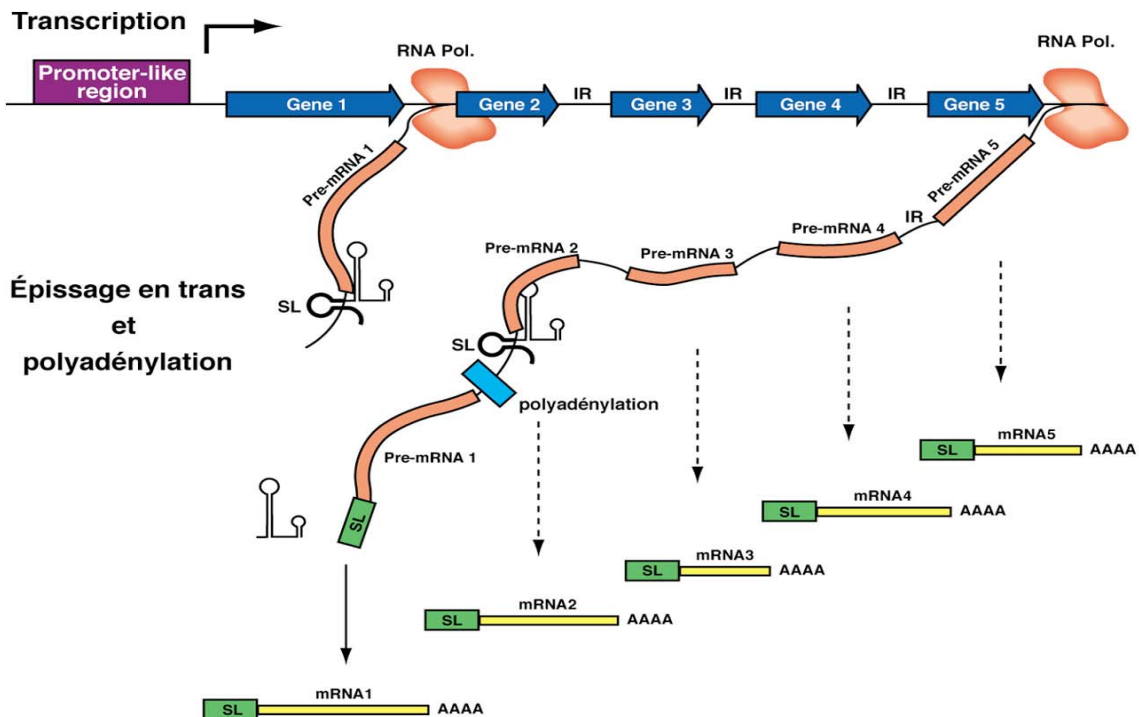


Figure 6. Maturation des transcrits chez *Leishmania*

Les gènes sont transcrits par l'ARN pol II en long pré-ARNm en l'absence de promoteur défini. La maturation des ARNm se fait par deux réactions de clivage. Lors de l'épissage en *trans*, le mini-exon (SL) de 39 nucléotides s'ajoute à la coiffe en 5' de chaque transcrit suivi de la polyadénylation par l'ajout de la queue de poly-A en 3'.

1.3.5 Éléments conservés dans le 3'UTR des ARNm

Leishmania n'ayant pas de régulation au niveau de l'initiation de la transcription, en l'absence de promoteur de l'ARN pol II (Clayton, 2002), régule son expression presque exclusivement au niveau post-transcriptionnelle. Il a été démontré pour plusieurs transcrits stade-spécifiques que des séquences en 3'UTR étaient impliquées dans leur régulation (Boucher *et al.*, 2002; Rochette *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2000). La régulation par des motifs en 3'UTR est très répandue non seulement chez *Leishmania* mais également chez les trypanosomes (Clayton, 2002). Un élément de 450 nucléotides conservé dans la région 3'UTR des ARNm de plusieurs gènes (~160) dont la majorité semble être exprimée au stade amastigote du parasite a été récemment identifié dans le laboratoire. Il a été démontré que cet élément joue un rôle important dans la régulation traductionnelle (Boucher *et al.*, 2002; Papadopoulou *et al.*, 2003a). L'élément de 450 nts se retrouve en 3'UTR de nombreux transcrits de la famille de l'amastine, nouvelle famille de protéines de surface

exprimée spécifiquement au stade amastigote (Rochette *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2000). Plus de 45 membres de cette famille ont été identifiés chez *Leishmania*. Tous les membres contiennent un domaine extracellulaire conservé de 11 acides aminés qui pourrait jouer un rôle dans la fonction de ces protéines. Ce domaine contient deux cystéines aux extrémités qui pourraient stabiliser le domaine par la formation d'un pont disulfure (Rochette *et al.*, 2005). Dans ce même article, deux nouveaux éléments, de 100 et 330 nucléotides, conservés ont aussi été décrits. Leur rôle reste encore inconnu mais ils sembleraient également impliqués dans la régulation amastigote-spécifique. Nous avons récemment démontré qu'un choc de température de 25°C à 37°C, tel que rencontré par le parasite lorsqu'il se trouve dans le sang et le macrophage, serait un signal important pour la régulation de ces transcrits via l'élément de 450 nts et possiblement de l'élément de 330 nts.

D'autres évidences d'une régulation de l'expression des gènes par le 3'UTR ont été décrites chez divers organismes (Joshi *et al.*, 2004; Mazumder *et al.*, 2003; Wilkie *et al.*, 2003). Le fait que le 3'UTR soit plus long que le 5'UTR chez la plupart des vertébrés, d'avantage chez les organismes évolués, pourrait aussi suggérer une régulation par cette région des transcrits (Gray and Wickens, 1998). En effet, l'augmentation de la longueur de la queue de poly-A corrèle avec l'activation de la traduction chez les eucaryotes supérieurs. Le 3'UTR comporte donc le signal de polyadénylation mais aussi celui qui dicte la localisation subcellulaire des transcrits (Mignone *et al.*, 2002). Chez *Caenorhabditis elegans*, une protéine (GLD) se lie également au 3'UTR et cause un raccourcissement de la queue de poly-A. Finalement, plusieurs facteurs qui se lient en 3'UTR des ARNm peuvent interagir avec ceux du 5'UTR et circulariser le transcrits. Cette circularisation entraîne un recyclage rapide de tous les facteurs nécessaires à l'initiation de la traduction.

1.4 Régulation de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes supérieurs

L'initiation de la traduction nécessite au moins l'assemblage de 11 facteurs dont plusieurs d'entre eux contiennent plusieurs peptides (Dever, 2002; Pestova *et al.*, 2001). Elle peut se diviser en trois étapes majeures soit : la liaison de Met-ARNt_i^{Met} à la petite sous unité

ribosomale; la liaison de cette sous unité à l'ARNm et la reconnaissance du codon d'initiation; puis la réunion de la large sous unité ribosomale pour la formation d'un ribosome fonctionnel.

1.4.1 Initiation de la traduction

La Figure 7 illustre les nombreuses étapes de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes. La première étape de l'initiation de la traduction, qui représente l'étape limitante, consiste en la liaison du facteur eIF4E à la coiffe des ARNm (m7GpppX). Cette coiffe empêche la dégradation des ARNm et favorise leur transport dans le cytoplasme (Kozak, 2003; Rom *et al.*, 1998). La protéine d'échafaudage ou de soutien de 220 kDa, eIF4G, se lie à eIF4E grâce à sa partie N-terminale. Cet immense facteur permet à d'autres protéines de s'y lier et de former le complexe d'initiation de la traduction. En effet, lorsque eIF4A, qui sert d'hélicase pour défaire les structures secondaires de l'ARNm, est recruté par eIF4G le complexe eIF4F est alors formé. Le facteur qui amène la sous unité ribosomale 40S près de la partie 5' des ARNm, eIF3, peut également se lier à eIF4G. D'un autre côté, le facteur eIF2 se lie à un Met-ARNt_i^{Met} lorsqu'il est lié à un GTP. Les autres facteurs, eIF5, eIF1 et eIF1A, font également parties du complexe d'initiation de la traduction, et leurs liaisons viennent former et stabiliser la sous unité 43S. Ce complexe avance sur l'ARNm en hydrolysant de l'ATP à la recherche d'un premier codon AUG dans un contexte approprié à l'initiation (Kozak, 1999). eIF1 assure la fidélité de la reconnaissance du codon d'initiation tandis que eIF5 est nécessaire pour l'hydrolyse du GTP du facteur eIF2. Cette hydrolyse entraîne la dissociation de plusieurs facteurs de la sous unité 40S. Le Met-ARNt_i^{Met} se retrouve ainsi sur le site P de l'ARNm. Le facteur eIF5B vient se lier et catalyse la formation du ribosome 80S par l'union des deux sous unités 40S et 60S en hydrolysant un GTP. Il est ensuite relâché et l'élongation peut débuter.

2002). Cette liaison entraîne une circularisation du transcrite et retient les facteurs nécessaires à la traduction à proximité du ribosome pour une réinitialisation immédiate. PABP1 joue un rôle de stabilisateur d'ARNm, d'initiation et de stimulation de la traduction (Kahvejian *et al.*, 2005; Wang and Grumet, 2004). Ce facteur contient quatre motifs de reconnaissance de l'ARN hautement conservés (Siddiqui *et al.*, 2003). Dans certaines situations, PABP1 peut aussi se lier à l'ARNm en 5' pour le protéger de la dégradation par des nucléases mais de cette manière, il bloque le ribosome dans sa recherche d'un codon AUG (Bag, 2001; Wilkie *et al.*, 2003). La traduction en est donc inhibée.

Son étude devient particulièrement intéressante chez *Leishmania* car PABP1 pourrait interagir avec les éléments conservés situés dans la partie 3' non traduits des quelques ARNm (voir la section 1.3.5 Éléments conservés dans le 3'UTR des ARNm) ou se lier à un autre facteur situé en 5' du transcrite pour augmenter l'efficacité de l'initiation de la traduction. Une équipe d'Angleterre a décrit que l'homologue de PABP1 chez *Leishmania*, LmPAB1, est exprimé aux deux stades du parasite, localisé principalement dans le cytoplasme et phosphorylé *in vivo* (Bates *et al.*, 2000). Ce facteur a aussi été caractérisé chez *Trypanosoma brucei* (Hotchkiss *et al.*, 1999).

1.4.3 Facteur d'initiation de la traduction eIF4E

Le eIF4E est le facteur qui détermine le taux de traduction chez la cellule car sa liaison à la coiffe en 5' représente la première étape de l'initiation de la traduction et constitue celle qui est limitante. Sa concentration dans la cellule est, par conséquent, faible. De plus, ce facteur peut être phosphorylé en position 209 par la protéine kinase MNK1, qui peut lier la partie C-terminale du facteur eIF4G. Étant donné que eIF4E a plus d'affinité pour la coiffe de l'ARNm lorsqu'il est phosphorylé, la traduction en est augmentée dans cette condition. La phosphorylation a lieu lorsque la cellule est traitée avec des hormones, des facteurs de croissance ou des mitogènes (Scheper and Proud, 2002; Topisirovic *et al.*, 2004). Une équipe de France a même démontré que ce facteur est phosphorylé à l'approche d'une différenciation cellulaire (Caron *et al.*, 2004). La structure 3D de eIF4E est conservée de la levure à l'humain (Sonenberg and Dever, 2003; Tomoo *et al.*, 2003). Des études ont montré que l'activité de eIF4E est dépendante du pH (Dlugosz *et al.*, 2003).

Trois familles de eIF4E ont été décrites; eIF4E-1, eIF4E-2 et eIF4E-3, dont chacune contient plusieurs membres (Joshi *et al.*, 2004). Les trois familles ont la capacité de lier la coiffe des ARNm avec des affinités différentes mais seulement la première famille peut aussi interagir avec eIF4G et la protéine liant le eIF4E, 4E-BP (eIF4E Binding Protein). Les deux autres familles interagissent soit avec 4E-BP ou soit avec eIF4G, respectivement. De plus, leurs expressions diffèrent également entre chaque famille. eIF4E-1 est retrouvé chez tous les eucaryotes tandis que eIF4E-2 n'est présent que chez les métazoaires et eIF4E-3 chez les chordés. Finalement, eIF4E-1 et eIF4E-2 sont exprimés ubiquitairement tandis que eIF4E-3 n'est détecté que dans quelques tissus.

Certaines hypothèses suggèrent que eIF4E aurait des rôles différents à l'intérieur du noyau de ceux du cytoplasme (Strudwick and Borden, 2002). Bien qu'un homologue nucléaire soit déjà décrit : le CBP (cap-binding protein), eIF4E se retrouve dans les corps nucléaires et aiderait au transport des ARNm hors de cette organelle, à l'épissage et au NMD (Nonsense Mediated Decay). L'idée de la traduction à l'intérieur du noyau est peu probable même si plusieurs autres facteurs de traduction se localisent aussi dans le noyau. Chaque facteur aurait des fonctions nucléaires propres.

Récemment, un homologue de eIF4E chez *Leishmania* (LeishIF4E) a été décrit (Yoffe *et al.*, 2004). Compte tenu que la coiffe des trypanosomes est différente des autres eucaryotes (Lewdorowicz *et al.*, 2004), l'activité de liaison à la coiffe de *Leishmania* en est donc modifiée. En effet, la coiffe des trypanosomes, nommée cap-4, subit des modifications uniques sur les quatre premiers nucléotides. C'est la raison qui explique que eIF4E de *Leishmania* ne peut remplacer eIF4E de la souris dans un système de traduction *in vitro*. De plus, LeishIF4E est incapable de lier le TMG (trimethyl guanosine), une forme hyperméthylée de la coiffe, et s'associe à la coiffe m⁷GTP avec peu d'affinité contrairement à celui de la souris. LeishIF4E est principalement situé dans le cytoplasme mais son rôle exact reste inconnu. Une autre étude a aussi caractérisé le complexe eIF4F chez *L. major* (Dhalia *et al.*, 2005).

L'inhibiteur principal de eIF4E est le 4E-BP. Son mode d'action consiste à séquestrer eIF4E pour inhiber la traduction. Il compétitionne avec eIF4G pour se lier sur le même site de eIF4E. Lors de condition de stress ou de privation nutritionnelle, 4E-BP est

hypophosphorylé et peut s'attacher à eIF4E (Dever, 2002). Par contre, des signaux extracellulaires tels que les facteurs de croissance et certaines hormones induisent l'hyperphosphorylation (phosphorylation à plusieurs sites) de 4E-BP qui ainsi amènent à la libération de eIF4E et l'augmentation de l'initiation de la traduction. Cependant, aucun homologue de cet inhibiteur n'a été retracé jusqu'à maintenant dans le génome de *Leishmania*.

1.4.4 Facteur d'initiation de la traduction eIF2

Le facteur eIF2 fait partie de la famille des protéines G et contient trois sous unités : α , β et γ . La sous unité β participe à l'échange du GDP pour un GTP en interagissant avec le facteur eIF5 tandis que la sous unité γ contient le site de liaison au GTP. Lorsque le facteur eIF2 contient un GTP, il peut initier l'élongation en amenant un Met-ARNt^{Met} au premier AUG du transcrit. Par contre, en condition de stress, plusieurs kinases phosphorylent la sérine de la sous unité α du facteur en position 51 (Dever, 2002). Ceci a pour but d'inhiber la traduction car cette sérine phosphorylée empêche l'échange GDP-GTP du facteur et, par conséquent, sa liaison avec le Met-ARNt^{Met}. eIF2 α joue alors un rôle important dans la régulation traductionnelle en conditions de stress (Kazemi *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2004b). Par contre, certains facteurs continuent d'être traduits tels que les facteurs de transcription ATF3 et ATF4 ou le facteur nucléaire NF- κ B pour activer une réponse intégrale face au stress (ISR) (Deng *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004a). La protéine GADD34 (ou MYD116) interagit avec la phosphatase PP1c et conduit à la déphosphorylation de eIF2 α pour réinitialiser la traduction (Novoa *et al.*, 2001; Novoa *et al.*, 2003).

Le facteur eIF2B est la GEF (guanine-nucleotide exchange factor) pour le facteur eIF2, c'est-à-dire qu'il catalyse l'échange du GDP pour un GTP. C'est un facteur important car l'affinité de eIF2 pour le GDP est 400 fois plus élevée que pour le GTP (Rafie-Kolpin *et al.*, 2003). Il comprend 5 polypeptides qui forment le complexe régulateur et le complexe catalytique. La phosphorylation de eIF2 α inhibe également l'activité de eIF2B en devenant un compétiteur (Krishnamoorthy *et al.*, 2001). En effet, la concentration de eIF2 est en

excès par rapport à celle de eIF2B. Ainsi, sa phosphorylation inhibe quantitativement eIF2B.

1.4.5 Les kinases de eIF2 α

Chez les eucaryotes, quatre kinases pouvant phosphoryler eIF2 α ont été identifiées (voir Figure 8). Bien qu'elles contiennent toutes un domaine régulateur différent, elles partagent un domaine kinase conservé. Leur activation lors de conditions de stress entraîne une baisse de la traduction générale (Sullivan *et al.*, 2004) bien que, dans quelques cas, il y a induction de la synthèse de certaines protéines, spécifiquement celles impliquées dans la réponse au stress (de Haro *et al.*, 1996). L'étude de ces kinases chez *Leishmania* s'est avérée nécessaire vu les changements environnementaux importants rencontrés lors de la différenciation du parasite. Une fois à l'intérieur du macrophage, le parasite subit plusieurs stress (pH, température, oxydation) qui pourraient entraîner la phosphorylation de eIF2 α et inhiber la traduction. La régulation de ces kinases dans ces conditions se doit d'être faite de façon rigoureuse pour permettre sa survie. Une étude précédente a déjà démontré qu'un choc thermique chez *Leishmania* conduit à plusieurs événements de phosphorylation et de déphosphorylation, particulièrement lorsque le parasite est virulent (Salotra *et al.*, 2000). La régulation cellulaire à des signaux extracellulaires ou à des stress a été longtemps considérée comme propre aux eucaryotes, cependant une sérine/thréonine kinase a récemment été identifiée chez *Mycobacterium tuberculosis* (Sharma *et al.*, 2004). Ce qui démontre l'efficacité et l'étendue de la phosphorylation dans la régulation cellulaire.

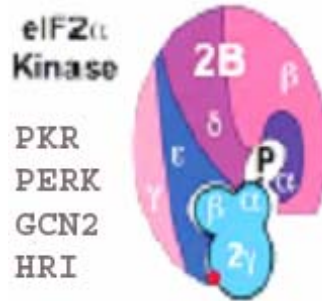


Figure 8. Les kinases de eIF2 α

Quatre kinases qui phosphorylent le facteur d'initiation eIF2 α ont été décrites jusqu'à maintenant. Elles sont activées par des stress différents mais ciblent spécifiquement le facteur eIF2 α . (source : Dever, 2002)

1.4.5.1 PERK

Les stress du réticulum endoplasmique (RE) (présence de protéines mal repliées) activent la kinase PERK (pancreatic endoplasmic reticulum eIF2 kinase). PERK prévient donc l'accumulation de protéines mutantes ou mal repliées. Certaines conditions pathophysiologiques peuvent aussi résulter à des stress du RE (Ron, 2002). La kinase PERK a été identifiée chez tous les organismes multicellulaires et se situe au niveau de la membrane du RE. La partie C-terminale de PERK est cytoplasmique et contient le domaine kinase. La protéine BiP se lie à la partie N-terminale de PERK dans le lumen du RE et, lors de condition de stress, s'en dissocie pour permettre l'oligomérisation de PERK. Cette dissociation permet à PERK de s'autophosphoryler et de s'activer pour, par la suite, phosphoryler eIF2 α et inhiber la traduction. Une délétion de la région permettant l'oligomérisation bloque l'activité kinase (Liu and Kaufman, 2003; Ma *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2004). Des études ont montré que l'activation de PERK amène celle du facteur Nrf2 qui à son tour contribue à la survie cellulaire face au stress oxydatif (Cullinan and Diehl, 2004).

1.4.5.2 PKR

La présence d'ARN double brin (souvent d'origine virale) même à de très faibles concentrations et d'aussi peu que de 11 paires de bases dans une cellule entraîne la phosphorylation de la kinase PKR, qui alors se dimérise et s'autophosphoryle (Baltzis *et al.*, 2002; Gunnery and Mathews, 1998). L'interféron- γ (IFN- γ) produit aussi ce résultat, ce

qui laisse croire que cette kinase serait impliquée dans la défense anti-virale (Wong *et al.*, 2001). L'expression d'inhibiteurs de PKR chez certains virus appuie également cette idée. En effet, la plupart des virus utilisent la machinerie cellulaire pour leur survie. Lorsque la traduction est inhibée chez l'hôte, leur prolifération l'est aussi. Par exemple, la protéine TAR du VIH se lie à l'ARNdb et inhibe l'activité de PKR. Ensuite, les poliovirus expriment une protéinase qui dégrade PKR. Il avait été suggéré que cette kinase pourrait aussi être impliquée dans la différenciation et prolifération cellulaire et dans les cascades signalétiques (de Haro *et al.*, 1996). L'inhibition de la traduction via la phosphorylation de PKR et de eIF2 α serait un mécanisme pour arrêter la progression de l'infection virale. Des études récentes ont montré qu'il y aurait une interaction croisée avec PERK pour arriver à cette fin (Baltzis *et al.*, 2004). Cette kinase possède deux domaines de liaison à l'ARNdb en N-terminale, le domaine kinase en C-terminale et le domaine servant à l'autophosphorylation à quelques 18 sites dans la partie centrale (Rafie-Kolpin *et al.*, 2003; Saunders and Barber, 2003). Des études de délétion dans la partie N-terminale de la protéine ont montré que cette partie n'est pas essentielle à l'activité *in vivo* mais servirait à la liaison de PKR aux ribosomes (de Haro *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1997).

Des études récentes ont montré que la régulation cellulaire par l'ARN est bien plus rapide et efficace qu'avec les protéines. Ces ARN-senseurs codant pour le TNF- α (tumor necrosis factor- α) et IFN- γ activent facilement PKR et conduisent à une réponse cellulaire immédiate ou même à une autorégulation chez l'humain (Kaempfer, 2003; Lai, 2003). Ils seraient activés par le changement de température ou la présence de métabolites. Ils adoptent alors une conformation de tige double brin dans les parties non traduites de l'ARNm qui active PKR parfois même plus fortement que l'ARNdb. Il est possible que chez *Leishmania* l'élément conservé de 450 nts dans le 3'UTR de certains gènes (voir section 1.3.5 Éléments conservés dans le 3'UTR des ARNm) puisse remplir ce rôle et aider le parasite à survivre lors de la différenciation.

PKR ne phosphoryle pas seulement eIF2 α mais aussi l'histone IIA, l'inhibiteur I κ B et la protéine Tat du VIH-1. Il se situe majoritairement dans le cytoplasme mais environ 20% de PKR cellulaire est localisé dans le noyau (Gunnery and Mathews, 1998). La kinase

nucléaire serait associée avec les ribosomes naissants. PKR est aussi activé par des ARN simple brin hautement structurés, l'héparine et quelques sucres reliés.

1.4.5.3 GCN2

La kinase GCN2 (general control of nitrogen metabolism kinase 2) contient un domaine semblable à l'histidyl-tRNA synthétase situé en C-terminale de la protéine (Rafie-Kolpin *et al.*, 2003). Ce domaine lie préférentiellement les ARNt non chargés versus l'ARNt aminoacétylés. Ainsi, lorsque GCN2 est lié à l'ARNt non chargés, le domaine kinase adjacent est activé par autophosphorylation et eIF2 α est phosphorylé. GCN2 est donc impliqué dans la régulation de la traduction lors de privation d'acides aminés. Celle de la levure, qui représente la seule eIF2 α kinase chez cette espèce, est aussi activée par le manque de purines et de glucoses, de même que par la forte concentration de sel (Kubota *et al.*, 2003). Son activation nécessite deux facteurs; soit GCN1 et GCN20 et entraîne, bien sûr, une diminution globale de la traduction via la phosphorylation de eIF2 α mais augmente la traduction de GCN4 qui active la transcription des enzymes nécessaires à la biosynthèse des acides aminés (Zhu *et al.*, 1996). Chez les mammifères, son rôle exact est encore peu connu. Le gène *gcn2* a été inactivé chez la souris et cette kinase ne semble pas être essentielle pour la croissance dans les conditions normales. Par contre, lors de privation d'acides aminés tels que; leucine, tryptophane et glycine durant la gestation, le taux de mortalité augmente significativement (Zhang *et al.*, 2002).

Des études récentes ont montré une interaction croisée avec la cascade signalétique TOR- rapamycine et l'activation de GCN2. En effet, la rapamycine active GCN2 même en l'absence d'ARNt non chargés (Kubota *et al.*, 2003). De plus, GCN2 peut être phosphorylé sur la S577 et conduit à une diminution de l'affinité pour les ARNt non chargés.

Plusieurs isoformes de GCN2 ont été identifiées : α , exprimé abondamment dans le cerveau, β , l'isoforme le plus abondant, et γ , retrouvé à des niveaux semblables dans six à huit tissus examinés. Cela suggère des fonctions développementales et physiologiques spécifiques pour chaque isoforme (Zhang *et al.*, 2002). En relation à cette hypothèse, une équipe des États-unis a identifié récemment deux eIF2 α kinases chez *Dictyostelium* qui semblent très

homologues à GCN2 et seraient impliquées dans l'initiation du développement de l'organisme (Fang *et al.*, 2003).

1.4.5.4 HRI

La kinase HRI (heme-regulated eIF2 α kinase) s'autophosphoryle à de multiples sites lors d'une déficience en hème pour inhiber la traduction via la phosphorylation de eIF2 α . En effet, HRI contient deux domaines de liaison à l'hème en N-terminale qui, une fois liés par l'hème, diminuent son activité. Il peut aussi être activé lors de stress oxydatif causé par l'arsénite (Rafie-Kolpin *et al.*, 2003) ou par une exposition à de fortes concentrations d'oxyde nitrique (Inuzuka *et al.*, 2004; Ishikawa *et al.*, 2002). Son inactivation se ferait par dégradation protéolytique car aucun événement de déphosphorylation n'a été observé avec HRI.

1.5 Objectifs

L'objectif général de mon projet de recherche consistait à étudier le rôle du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α dans la régulation traductionnelle chez *Leishmania* en condition de stress et/ou au cours de la différenciation du parasite.

Nos objectifs spécifiques étaient 1) de caractériser le facteur eIF2 α chez *Leishmania*; 2) d'étudier son expression au cours de la différenciation; 3) de déterminer si eIF2 α était phosphorylé dans certaines conditions de stress intramacrophagiques, comme c'est le cas chez d'autres eucaryotes et; 4) d'identifier les homologues de kinases capables de phosphoryler eIF2 α (les eIF2 α kinases) chez *Leishmania* avec une emphase particulière à la kinase PKR activée par des structures d'ARNdb.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons appliqué une série d'expérimentations incluant des méthodes moléculaires, de culture cellulaire, de purification de complexes protéiques associés aux ribosomes, des immunobuvardages, des immunoprécipitations et des essais kinases. L'identification de voies essentielles, pour la phosphorylation du facteur eIF2 α , par exemple, pour la différenciation ou la survie du parasite pourrait aider au développement de nouveaux traitements plus efficaces.

2 Matériels et Méthodes

2.1 Clonage de eIF2 α

Le Tableau 2 regroupe les différentes constructions effectuées avec le gène codant pour le eIF2 α de *L. major* en sa forme sauvage et mutante.

Tableau 2. Différentes constructions avec eIF2 α de *L. major*

| Nom | Vecteur d'origine | Insert | Amorce | Utilité |
|-----------------------|---|----------------------|---|---|
| pET-2 α | pET16b (Novagen) | eIF2 α | 5'GTCATATGATGCGTGACCTGAACAAG 3'GGGATCCCATATGTTAGTCCGCATCCTCATC | Production de eIF2 α recombinant |
| pET-2 α T185V | pET16b (Novagen) | eIF2 α -T185V | 5'GTCATATGATGCGTGACCTGAACAAG 3'GGGATCCCATATGTTAGTCCGCATCCTCATC | Production de eIF2 α recombinant mutant |
| pNéo-2 α | pSP72 α néo α (Papadopoulou <i>et al.</i> , 1992) | eIF2 α | 5'ATGCGTGACCTGAACAAGCGC 3'TTAGTCCGCATCCTCATCATCATC | Surexpression de eIF2 α chez <i>Leishmania</i> |
| pNéo-2 α T185V | pSP72 α néo α (Papadopoulou <i>et al.</i> , 1992) | eIF2 α -T185V | 5'ATGCGTGACCTGAACAAGCGC 3'TTAGTCCGCATCCTCATCATCATC | Surexpression de eIF2 α mutant chez <i>Leishmania</i> |
| pGMCSF-2 α | pcDNA3.1 (Invitrogen) | eIF2 α | 5'TTCTCTCCGCGCCGCTGTGGAGGGTGAGACG 3'CCTATTTTGC GCGCCGCTGTATTAGTCCGCATC | Injection d'ADN chez la souris pour la production d'un anticorps anti-eIF2 α |

2.2 Mutagenèse dirigée sur eIF2 α

Le kit « QuickChange Site-Directed Mutagenesis » (Stratagene) a été utilisé pour modifier la thréonine 185 de eIF2 α en valine sur les plasmides pET-2 α et pNéo-2 α (voir Tableau 2). Les deux amorces complémentaires employés sont 5'-GTA CAC GGA GGT GGT TAG ACG CCG TGT G et 3'-CAC ACG GCG TCT AAC CAC CTC CGT GTA C. La réaction a été préparée selon le protocole fourni par la compagnie Stratagene. Les concentrations d'ADN testées sont de 10 μ g, 50 μ g et 100 μ g. Les paramètres des cycles de PCR sont celles indiqués dans le manuel. La température d'appariement est de 50°C et celle d'élongation de 68°C. La réaction a été digérée pendant 1 hre avec *Dpn I* puis transformée dans les cellules compétentes *E.coli* DH5 α . La vérification de la mutation a été effectuée par séquençage.

2.3 Culture cellulaire et transfection

La souche de *Leishmania donovani infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) a été utilisée pour nos études. La méthode de culture axénique est décrite ci-dessus (voir section 1.2.3 Culture axénique). Le milieu SDM contient 10% de FBS décomplémenté (Multicell, Wisent inc.) et 5 µg/ml d'hémine (Sigma). 5×10^6 parasites ont été transfectés par électroporation à 450 V et 500 µF et environ 15 µg d'ADN sont habituellement utilisés. La sélection des transfectants se fait avec 40 µg/ml de G418 (Geneticin, Gibco BRL) après 24 hres de croissance pour sélectionner les vecteurs d'expression résistants à la néomycine.

2.4 Induction de stress chez le parasite

Les stress de pH et de température ont été réalisés dans le milieu RPMI 1640 complété avec du FBS décomplémenté à 10% (Multicell, Wisent inc.) et 5 µg/ml d'hémine (Sigma). Les promastigotes sont cultivés dans ce milieu à pH 7.2 et à 25°C jusqu'à l'obtention de la phase logarithmique puis transférés dans l'incubateur à 37°C pendant 2 heures avec un apport de 5% de CO₂. Les cellules ont été ensuite centrifugées et resuspendues dans un milieu RPMI à pH 5.5 préalablement incubé à 37°C. Après différents temps d'exposition aux stress (30 min, 2 hres et 5 hres), les cellules ont été récoltées puis lysées avec une solution contenant 1% de Triton et des inhibiteurs de phosphatase ont été ajoutés au mélange.

Le stress induit par la drogue thapsigargine (inhibe les pompes à calcium du RE) a été réalisé également dans le milieu RPMI à pH 7.2. Les promastigotes ont été incubés à 25°C avec de la thapsigargine à une concentration finale de 1 µM lorsqu'ils ont atteint la phase logarithmique. Après 30 min, 1hre et 4 hres en présence de thapsigargine, les cellules ont été récoltées et lysées comme décrit ci-haut.

2.5 Production et purification de eIF2α recombinant

Le gène correspondant au facteur eIF2α a été fusionné avec une queue d'histidine dans le vecteur d'expression pET16b (Novagen) et ce plasmide a été transformé chez *E. coli* HMS 174. La protéine recombinante a été induite avec 1 mM IPTG à 37°C pendant 6

heures. Les bactéries ont été récoltées puis lysées par sonication 8 fois 1 minute avec intervalle de 1 minute sur glace. Une centrifugation a été réalisée pour clarifier le lysat et le surnageant a été déposé sur une colonne de Nickel (Novagen) pour purifier la protéine recombinante. L'expérience a été suivie en détail selon le protocole de la compagnie. Les protéines semi-purifiées ont été ensuite dialysées pendant 16 heures dans 800 ml de PBS. La protéine purifiée a été conservée à -80°C. La vérification de la pureté et de la concentration a été réalisée par immunobuvardage anti-His₆ et par coloration d'un gel SDS-PAGE au bleu de Coomassie. La coloration a été de 30 min et la décoloration avec une solution de 40% méthanol et 7% acide acétique de 30 min.

2.6 Hybridation et transfert de type Northern

L'ARN total a été extrait des parasites selon le protocole TRIzol (Invitrogen). 30 µg d'ARN ont été déposés sur un gel dénaturant de formamide et hybridés avec une sonde spécifique à eIF2 α de *L. major* marquée au [α -³²P]-dCTP. La préhybridation, l'hybridation ainsi que les lavages ont été effectués tels que décrits précédemment (Sambrook *et al.*, 1989).

2.7 Immunobuvardage

50 µg d'extraits de protéines ont été migrés sur un gel SDS-PAGE 10% puis transférés à 350 mA pendant 1h30 sur une membrane de PVDF (Immobilon P-Millipore). La membrane a été alors bloquée avec du lait écrémé 5% dans du 1% Tween-20-PBS pendant 1 heure puis incubée avec le premier anticorps anti-His₆ (Research Diagnostic Inc.), anti-eIF2 α de *Leishmania* (voir section 2.11 Production d'un anticorps anti-eIF2 α chez la souris) ou un phospho-anticorps anti-eIF2 α [pS⁵²] de souris (Biosources international) pendant 1h30. Après plusieurs lavages avec le PBS-1% Tween-20, la membrane a été incubée avec le 2^e anticorps anti-IgG de lapin ou de souris, selon le cas, couplé à la HRP (Horse radish peroxidase) pendant 45 minutes puis lavée. La révélation a été faite avec de la chemiluminescence (ECL). L'exposition a été réalisée avec des films Kodak.

L'immunobuvardage contre la eIF2 α kinase PKR se fait de la même manière que pour le facteur eIF2 α . Deux anticorps reconnaissant le PKR murin ont été utilisés : B-10 et D-20 (Santa Cruz Technology). L'anticorps B-10 nécessite un 2^e anticorps de souris anti-IgG couplé à la HRP tandis que D-20, un de lapin.

2.8 Gradient de sucrose et profil de polyribosomes

60 ml de culture de *Leishmania* ont été récoltés en phase logarithmique. Ils ont été d'abord incubés dans 5 ml de SDM contenant 100 μ g/ml de cycloheximide, un inhibiteur de l'élongation de la traduction, et des inhibiteurs de phosphatases (Sigma) puis lavés avec 5 ml de PBS contenant également 100 μ g/ml de cycloheximide et des inhibiteurs de phosphatases. Le culot a été resuspendu dans la solution de lyse puis lysé par homogénéisation. Les débris ont été centrifugés à 10 000 rpm pendant 15 min et le surnageant a été dosé par spectrophotomètre à 260 nm et 40 unités de densité optique ont été déposées sur un gradient de sucrose linéaire de 15%-45%. Les gradients ont été ultracentrifugés à 35 000 rpm pendant 2h15 dans le rotor SW40 TI (Beckman). Les fractions de 600 μ l ont été récoltées à l'aide d'un système de fractionnement d'un gradient de densité (ISCO). La concentration d'ARN a été mesurée au cours de la récolte des fractions à 254 nm. Les protéines de ces fractions ont été précipitées à l'aide d'éthanol 100%. Les culots ont été lavés avec de l'éthanol 80%.

2.9 Immunoprécipitation et essai kinase

500 μ g d'extrait de protéines ont été incubés pendant 15 minutes avec l'anticorps anti-PKR (B-10) de souris (Santa Cruz Biotechnology) puis avec les billes d'agarose couplées à un anti-IgG de souris (Sigma) pendant 1 heure. Les billes ont été lavées trois fois puis 1 μ l de γ -³²P-ATP y a été ajouté aux billes et incubées 15 minutes à 37°C. Le tout a été dénaturé à 95°C et migré sur un gel de SDS-PAGE 10%. L'autoradiogramme a été obtenu après une nuit d'exposition -80°C.

2.10 Précipitation à l'aide d'ARNdb et essai kinase

La procédure pour cette expérience est décrite dans la section 2.9 Immunoprécipitation et essai kinase. Cependant, il n'y a nul besoin d'anticorps et les billes utilisées sont des billes d'agarose couplées à des brins de poly-(rIrC) (Amersham). Ces brins mimiquent l'ARNdb et, par conséquent, devraient activer PKR.

2.11 Production d'un anticorps anti-eIF2 α chez la souris

Cinq souris femelles BALB/c de six à huit semaines ont été utilisées. Une fusion du gène eIF2 α de *L. major* avec le gène de GM-CSF humain a été effectuée et clonée dans un vecteur d'expression eucaryote pcDNA3.1 (Invitrogen). Une fois cette protéine de fusion exprimée chez la souris, elle sera sécrétée à l'aide de la séquence de GM-CSF. Le plasmide pGMCSF-2 α (voir Tableau 2) doit se trouver à une concentration minimale de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. 50 μl d'ADN (100 μg) ont été injectés dans le muscle Tibialis antérieur de la souris. L'injection a été alternée entre la patte gauche et droite. Les injections ont été effectuées au jour 0, 7, 21 et 28. Le sérum a été collecté au jour 42. La détection d'un anticorps a été faite par immunobuvardage à une dilution de 1 : 100 ou 1 : 500. S'il y a une réponse positive, les souris étaient sacrifiées au jour 49 et le sérum collecté est conservé à -20°C. Pour générer un anticorps monoclonal, la rate est prélevée des souris immunisées et mise en culture en présence des cellules lymphocytaires B pour former des hybridomes selon le protocole de la compagnie (StemCell).

3 Résultats

3.1 Le facteur eIF2 α

Compte tenu que la régulation traductionnelle occupe une place importante chez *Leishmania*, la régulation de la synthèse protéique via l'inhibition de la traduction en condition de stress par la phosphorylation du facteur eIF2 α doit sûrement exister chez ce parasite. Des études précédentes dans le laboratoire ont montré qu'il y a une diminution de la traduction chez *Leishmania* suite à quelques heures de stress combinés de pH et de température ainsi que de la présence de thapsigargine. Cependant, ce n'est pas encore clair si cette diminution de la traduction est observée suite à la phosphorylation du facteur eIF2 α . Par des analyses de comparaison de séquence (BLAST), nous avons identifié le gène LmjF 03.0980 qui semble être l'homologue de eIF2 α chez *Leishmania* (voir Figure 9). Le pourcentage d'homologie entre le eIF2 α de *Leishmania* et celui de l'humain et de la souris est de 46% et les acides aminés semblables ou identiques se situent principalement en N-terminale plus précisément autour du site de phosphorylation (voir Figure 9). Contrairement aux eIF2 α humain et murin qui ont une sérine en position 51, *Leishmania* possède une thréonine en position 185 qui est entourée par des acides aminés conservés du site de phosphorylation. Il est à noter que le eIF2 α de *Leishmania* a une extension en N-terminale qui n'est pas retrouvée chez les autres eucaryotes. Pour évaluer l'implication de la thréonine en position 185 à la phosphorylation de eIF2 α , nous avons effectué une mutagenèse dirigée pour muter le site de phosphorylation potentiel en valine. La mutagenèse a été effectuée sur le plasmide pET-2 α et pNéo-2 α (voir Tableau 2). Ces plasmides pourront, respectivement, permettre de purifier la protéine eIF2 α recombinante, sauvage et mutante, et de le surexprimer chez *Leishmania*.

| | | | | | |
|-------------------------------|------------|-------------|--------------|--------------------------|-------------------------|
| | 1 | | | | 50 |
| eIF2 α humain | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ |
| eIF2 α souris | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ |
| eIF2 α <i>L. major</i> | MWVSLCRPLE | RIIFCNNE SM | ASYCVTDSPE | TVDYKTKCCC | RTTDNVYYAV |
| | 51 | | | | 100 |
| eIF2 α humain | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ |
| eIF2 α souris | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ |
| eIF2 α <i>L. major</i> | PKEYFRLNQS | LARRKLLLA E | PFVPVDCRT | LDHLLVLEK | ATILSAQVVE |
| | 101 | | | | 150 |
| eIF2 α humain | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~MPGLSCR | FYQHKFPEVE |
| eIF2 α souris | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~MPGLSCR | FYQHKFPEVE |
| eIF2 α <i>L. major</i> | GETKGSNNER | PEWMRDLNKR | QQKFVCGCLG | ITSWDGDIP | FYVETMPKIN |
| | 151 | | | | 200 |
| eIF2 α humain | DVVMVNRSI | AEMGAYVSL L | EYNNIEGMIL | LSEL S RRRIR | SINKLIRIGR |
| eIF2 α souris | DVVMVNRSI | AEMGAYVSL L | EYNNIEGMIL | LSEL S RRRIR | SINKLIRIGR |
| eIF2 α <i>L. major</i> | DVVWVKITQV | NDTSAVVQL L | EYGKREGIIP | YTEV T RRRV R | SMGKLIKVGR |
| | 201 | | | | 250 |
| eIF2 α humain | NECVVIRVD | KEKGYIDL SK | RRVSPEEAI K | CEDKFTKSK T | VYSILRHVAE |
| eIF2 α souris | NECVVIRVD | KEKGYIDL SK | RRVSPEEAI K | CEDKFTKSK T | VYSILRHVAE |
| eIF2 α <i>L. major</i> | TEPAQVIRID | KDKGYIDL SK | KLVTTPNEA KA | CEAHFRQGN E | VR S IVCHVAE |
| | 251 | | | | 300 |
| eIF2 α humain | VLEYTKDEQL | ESLFQRTAW V | FDDKYKRP GY | GAYD...AFK | HAVSDPSILD |
| eIF2 α souris | VLEYTKDEQL | ESLFQRTAW V | FDDKYKRP GY | GAYD...AFK | HAVSDPSILD |
| eIF2 α <i>L. major</i> | LCDIPAMDAM | EMI.....A | YPLYQREPG K | HAWTWLYEL N | QTEDVERILG |
| | 301 | | | | 350 |
| eIF2 α humain | SLDLNEDERE | VLINNINRRL | TPQAVKIRAD | IEVACYGYEG | IDAVKEALRA |
| eIF2 α souris | SLDLNEDERE | VLINNINRRL | TPQAVKIRAD | IEVACYGYEG | IDAVKEALRA |
| eIF2 α <i>L. major</i> | PLKLEKAISD | CLMLTLKNAM | RLKVLTLFAE | VEITCFACDG | VEAIRDVLIL |
| | 351 | | | | 400 |
| eIF2 α humain | GLNCSTENMP | ...IKINLIA | PPRYVMTTTT | LERTEGLSVL | SQAMAVIKEK |
| eIF2 α souris | GLNCSTETMP | ...IKINLIA | PPRYVMTTTT | LERTEGLSVL | NQAMAVIKEK |
| eIF2 α <i>L. major</i> | GRSYGEGSDP | QIHLSVNIIG | PPKYGIRART | DMKEEGIQRM | KEAIEAMTAE |
| | 401 | | | | 450 |
| eIF2 α humain | IEEKRGVFNV | QMEPKVVTDT | DETELARQME | RLERENAEVD | GDDDAEEMEA |
| eIF2 α souris | IEEKRGVFNV | QMEPKVVTDT | DETELARQLE | RLERENAEVD | GDDDAEEMEA |
| eIF2 α <i>L. major</i> | IKKRGGQLKV | VSPPPQPHGDA | DEGKKGFDGE | ~~~~~ | ~DDDEDAD~ |
| | 451 | | | | |
| eIF2 α humain | KAED | | | | |
| eIF2 α souris | KAED | | | | |
| eIF2 α <i>L. major</i> | ~~~~~ | | | | |

Figure 9. Alignement de séquences entre le facteur eIF2 α de l'humain, de la souris ainsi que de *L. major*

Les acides aminés identiques sont surlignés en jaune et ceux qui sont semblables, en bleu. Le site de phosphorylation (potentiel chez *Leishmania*) est en rouge en position 185 de la figure. La région conservée autour du site de phosphorylation est souligné en mauve. Il est possible de remarquer que la partie N-terminale est mieux conservée que la partie C-terminale.

3.1.1 Production de eIF2 α recombinante chez *E. coli*

Sur la Figure 10A, il y a la schématisation de la construction ayant permis la purification de la protéine recombinante eIF2 α sauvage et mutante en position 185. Le gène du facteur eIF2 α de *L. major* a été fusionné à une queue d'histidine (His₆) en N-terminale. La forme sauvage est représentée en haut et la forme mutante, en bas, avec l'indication de la position de la mutation. Des cinétiques d'induction de l'expression de ces protéines avec de l'IPTG ont été effectuées. L'expression de la protéine eIF2 α -His et du mutant eIF2 α T185V-His atteint le maximum après 6 hres d'induction (voir Figure 10B). En Figure 11, les protéines recombinantes, sauvage et mutante, purifiées sur une colonne de Nickel sont déposées sur gel SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie. Il est possible de voir que les deux protéines ne sont pas parfaitement pures et que leurs concentrations avoisinent les 50 ng/ μ l lorsqu'elles sont comparées à une protéine de concentration connue, le BSA. Au bas de la Figure 10B, un immunobuvardage anti-His₆ montre que les protéines recombinantes sont exprimées chez *E. coli* et présentes dans toutes les fractions. Compte tenu que les anticorps commerciaux anti-eIF2 α ont donné énormément de bruits de fond (non montré), la production d'un anticorps spécifique au eIF2 α de *Leishmania* fût la prochaine étape essentielle du projet.

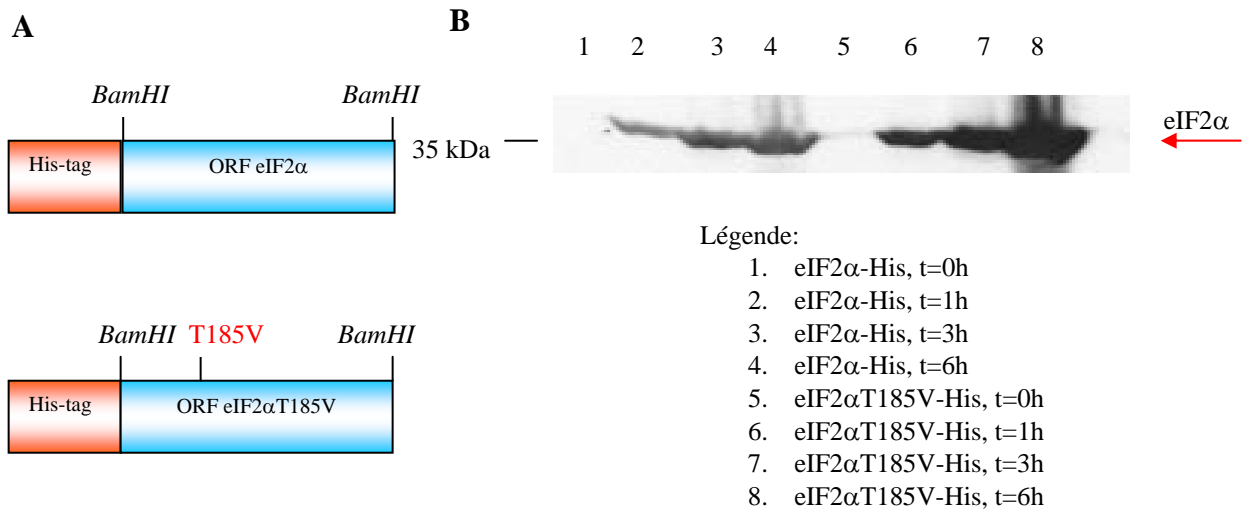


Figure 10. Induction de la protéine recombinante eIF2 α

(A) Schématisation de eIF2 α recombinante sauvage et mutant. La protéine recombinante mutante contient une mutation à la thréonine 185 pour une valine. (B) Immunobuvardage anti-His₆ sur des extraits de *E. coli* après différents temps d'induction à l'IPTG. Au temps 0, aucune détection de eIF2 α n'est observée. Après 1 hre d'induction avec de l'IPTG, il y a synthèse de la protéine recombinante, sauvage et mutante. Les protéines s'accumulent en fonction du temps d'induction et le maximum est atteint après 6 hres.

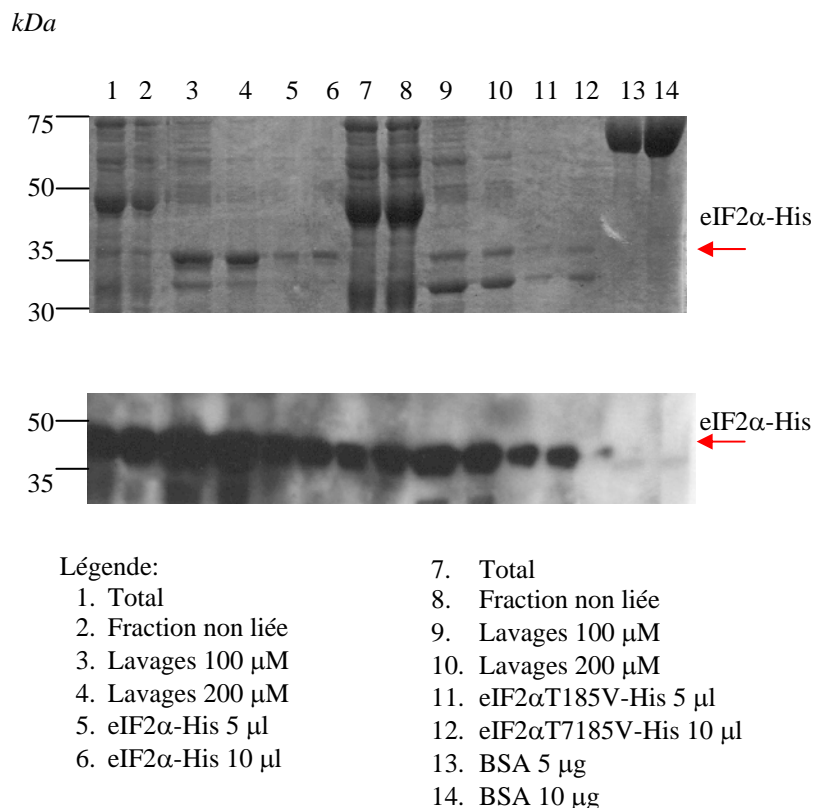


Figure 11. Protéine recombinante eIF2 α

Haut : **eIF2 α recombinante sur un gel coloré au bleu de Coomassie** La protéine recombinante s'enrichit de plus en plus au cours de la purification. Les fractions 1 à 6 concernent la eIF2 α recombinante sauvage et celles de 7 à 12, la mutante. Bas : **Immunobuvardage anti-His₆**. Une protéine d'environ 36 kDa est fusionnée à la queue d'histidine et purifiée. La pureté est évaluée à environ 70% et la concentration est de 50 ng/ μ l. Total représente l'extrait total de *E. coli*, tandis que Fraction non liée contient toutes les protéines n'ayant pas lié la colonne de Nickel. Les lavages 100 μ M et 200 μ M sont les lavages effectués avec 100 μ M et 200 μ M d'imidazole, respectivement. eIF2 α -His et eIF2 α T185V-His consiste en la protéine purifiée. Le volume indiqué représente ce qui a été déposé sur gel.

3.1.2 Expression de eIF2 α chez le parasite

Dans le but d'étudier l'expression de eIF2 α au cours du cycle de développement du parasite, nous avons hybridé l'ARN total provenant des deux stades du parasite, promastigote et amastigote, avec une sonde spécifique pour le gène eIF2 α de *L. major*. Les expériences Northern ont démontré que eIF2 α est un peu plus exprimé au stade amastigote du parasite (voir Figure 12A). Pour vérifier le niveau de protéine synthétisée aux deux stades, nous avons effectué des expériences d'immunobuvardage avec l'anticorps de eIF2 α de *Leishmania* qui a été généré chez la souris (voir Tableau 2). Cet anticorps polyclonal reconnaît une protéine d'environ 42 kDa (voir Figure 12B). Le poids moléculaire de cette

protéine suggère que le eIF2 α chez *Leishmania* contient une extension d'environ 140 acides aminés en N-terminale, comparé aux autres homologues de eIF2 α chez les eucaryotes supérieurs. Initialement, nous avons construit la fusion avec la queue d'histidine de la protéine recombinante eIF2 α avec une séquence plus courte (début à la 3^e méthionine de la Figure 9) en se basant sur les autres eIF2 α . Ceci explique pourquoi notre protéine recombinante chez *E. coli* est de 36 kDa ainsi que le même facteur surexprimé chez *Leishmania* (voir Figure 10B, Figure 11 et Figure 12B). Les expériences ont montré que la protéine eIF2 α est exprimée au même niveau entre les promastigotes et les amastigotes (voir Figure 12B).

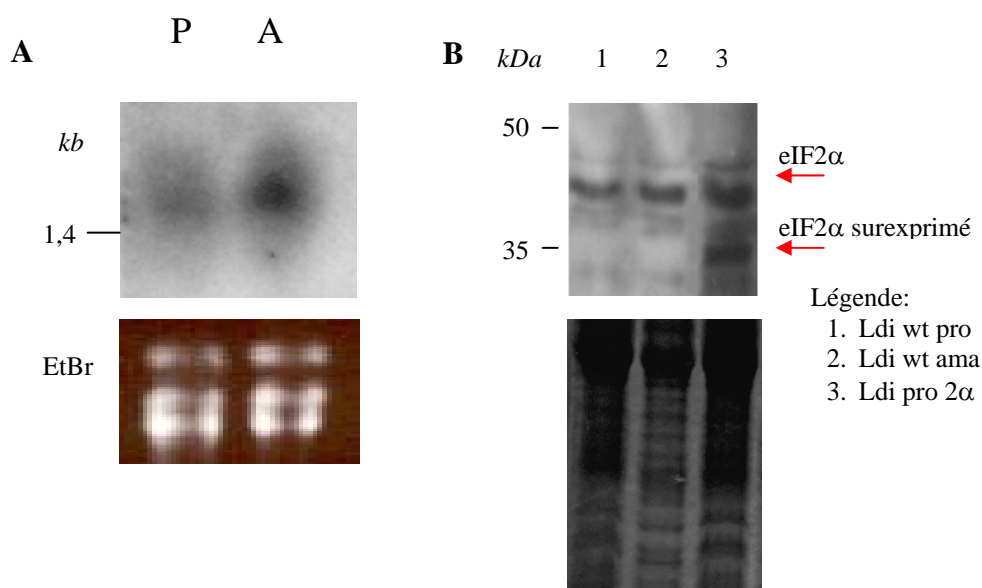


Figure 12. Expression eIF2 α chez *Leishmania*

(A) Hybridation Northern. La grandeur du transcrit qui est légèrement supérieure à 1,4 kB corrèle bien avec la taille de l'ORF qui est d'environ 1 kB additionné des régions en 5' et 3'. Le transcrit est plus présent chez les amastigotes. P : promastigote, A : amastigote. **(B) Haut : Immunobuvardage anti-eIF2 α .** La taille observée ici semble bien correspondre au facteur d'intérêt. L'expression semble constitutive aux deux stades du parasite. Chez le transfectant Ldi pro 2 α , qui surexprime le facteur eIF2 α , deux bandes sont observables. La protéine surexprimée est légèrement plus petite que le eIF2 α endogène (voir explication dans le texte). Avec les souris non immunisées, aucun signal n'est observé (non montré). **Bas : Le gel coloré au bleu de Coomassie.**

3.1.3 Le facteur eIF2 α est associé aux sous unités 40S et 60S des ribosomes

Le gradient de sucrose (15%-45%) permet de séparer les sous unités ribosomales, les monosomes ainsi que les polyribosomes selon leur coefficient de sédimentation. Ainsi, les sous unités ribosomales et les monosomes se retrouvent dans le haut du gradient tandis que les polysomes dans le bas. Il est alors possible d'extraire les protéines de ces fractions et de les déposer sur un gel SDS-PAGE. Puis, un immunobuvardage permet d'identifier les facteurs d'initiation de la traduction ou du moins les protéines qui interagissent avec les ribosomes et, par le fait même, de les localiser. Le facteur eIF2 α semble s'associer plus abondamment avec les monosomes qu'avec les polysomes sur un gradient de sucrose, du moins au stade promastigote. En effet, sur la Figure 13A, le signal disparaît après la 6^e fraction, début des polysomes. Cela s'explique, bien sûr, par le fait que le facteur eIF2 se dissocie du complexe d'initiation de la traduction après avoir amené le premier acide aminé (Met) à la sous unité 43S pour subir à nouveau l'échange GDP-GTP.

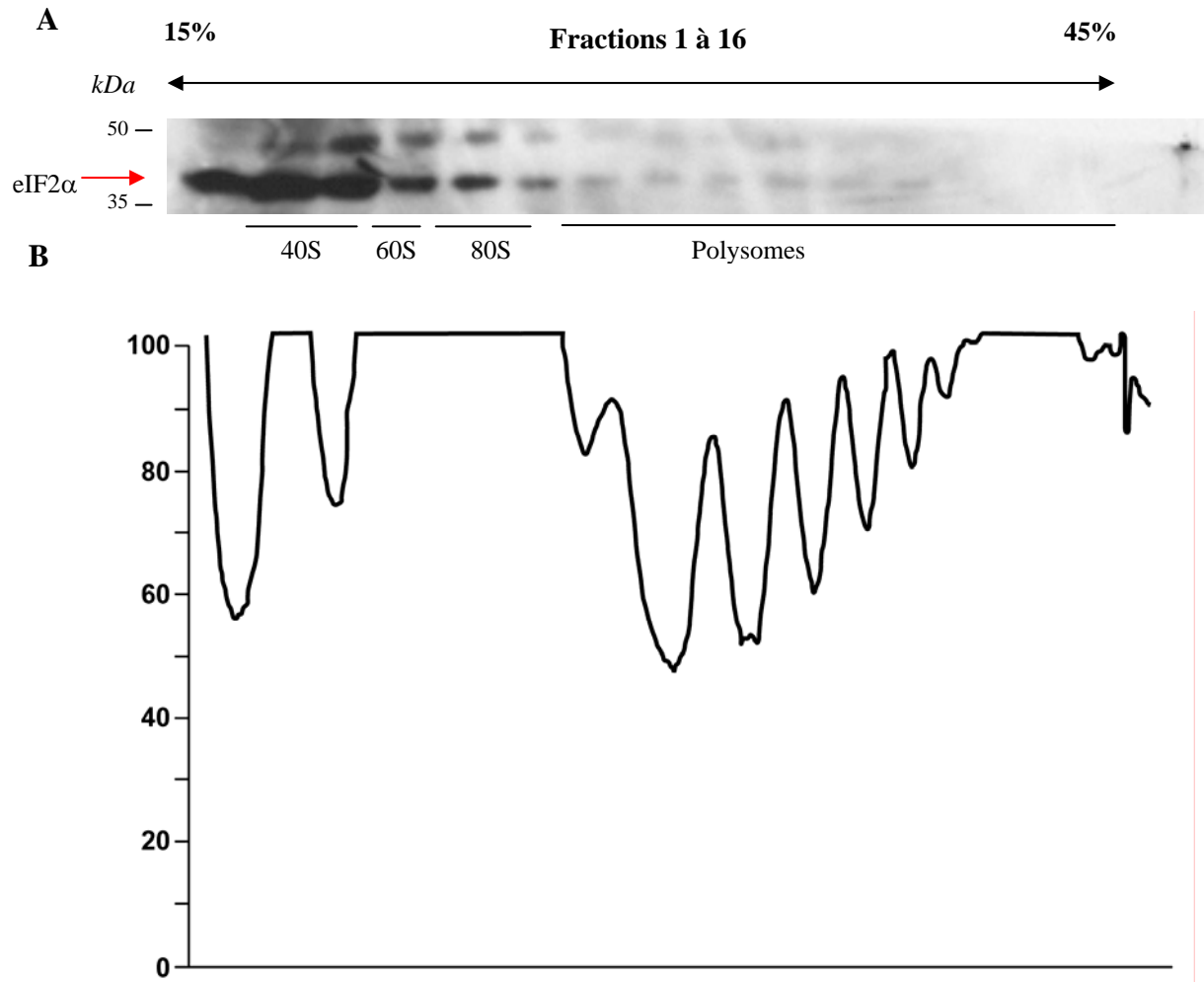


Figure 13. Association du facteur eIF2 α aux ribosomes à travers un gradient de sucrose

(A) **Immunobuvardage anti-eIF2 α .** L'immunobuvardage contre eIF2 α sur les fractions récoltées d'un gradient de sucrose montre que ce facteur est seulement associé aux sous unités ribosomales et aux monosomes chez le promastigote. (B) **Le profil de polyribosomes.** Un profil montre la position de fraction ainsi que le taux de traduction en général. Les valeurs du quadrillage ne facilitent que la comparaison et n'indiquent aucunement une valeur quantitative.

3.1.4 Phosphorylation de eIF2 α en condition de stress

Pour déterminer si le facteur eIF2 α pourrait être phosphorylé en condition de stress chez *Leishmania*, nous avons effectué un immunobuvardage en utilisant un phospho-anticorps eIF2 α commercial (Biosources international). L'utilisation de cet anticorps est possible parce que la région autour du site de phosphorylation chez le eIF2 α de *Leishmania* est très conservée (voir Figure 9). L'immunobuvardage avec cet anticorps montre qu'il y a un

signal beaucoup plus fort chez les amastigotes comparativement aux promastigotes qui correspondent à l'état non stressé (voir Figure 14). Étant donné que l'expression de la protéine demeure comparable aux deux stades (voir Figure 12B), cette phosphorylation stade-spécifique est signe qu'il y a une régulation de la synthèse protéique via une inhibition de la traduction par la phosphorylation de eIF2 α spécifiquement au stade amastigote, et ce, probablement dû aux stress rencontrés par le parasite au cours de sa différenciation. Étant donné que la protéine est phosphorylée durant la différenciation du parasite de promastigote en amastigote, il se peut que dans certaines conditions de stress qui mimiquent l'environnement du macrophage, il en soit de même. Quelques extraits ont été préparés à la suite de stress de pH, de température et de drogue thapsigargine et ont été déposés sur gel et réagis avec le phospho-anticorps eIF2 α . Cette expérience démontre que l'expression de la protéine varie très peu au cours des deux types de stress (pH-température et thapsigargine) mais que le niveau de phosphorylation augmente considérablement (voir Figure 14). Les signaux les plus forts sont retrouvés dans les puits 5 et 8 correspondant aux stress de pH et température 5 hres et thapsigargine 5 hres.

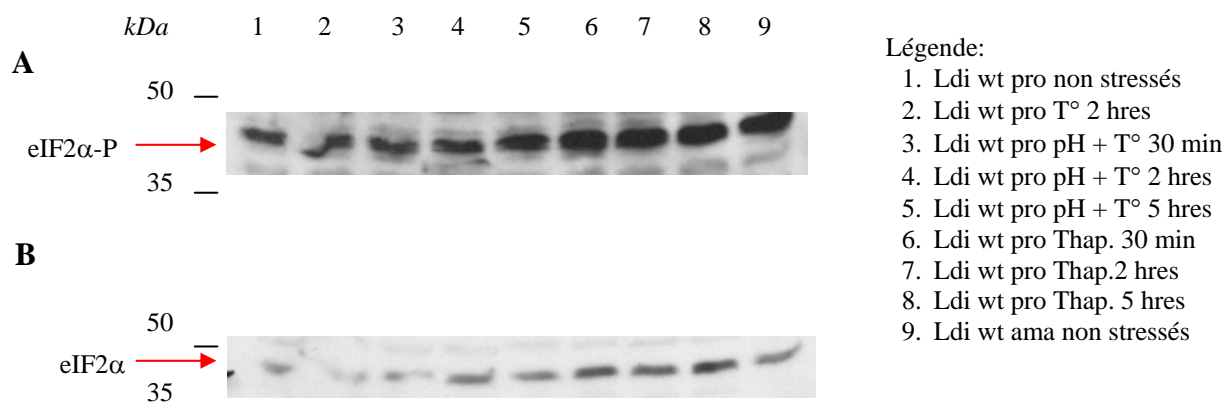


Figure 14. Niveau de phosphorylation de eIF2 α chez des parasites stressés

(A) **Immunobuvardage avec un phospho-anticorps eIF2 α .** La phosphorylation des protéines semble augmenter selon la durée du stress, particulièrement suite au stress par la thapsigargine qui induit un stress du RE. On remarque également que la phosphorylation est plus importante chez les amastigotes non stressés que chez les promastigotes. (B) **Immunobuvardage anti-eIF2 α .** La quantité de protéines varie très peu au cours des stress subis.

3.2 La eIF2 α kinase : PKR

3.2.1 *Leishmania* possède plusieurs homologues de eIF2 α kinases

Étant donné que le facteur eIF2 α est phosphorylé à la suite de certaines conditions de stress (voir Figure 14), il existe sûrement des eIF2 α kinases chez *Leishmania* qui sont capable de phosphoryler cette protéine. Des études de BLAST sur le génome de *L. major* (www.GeneDB.org) ont permis de cibler des homologues potentiels des quatre eIF2 α kinases retrouvées chez les autres eucaryotes (voir Tableau 3). *Leishmania* semble posséder des homologues de chacune de ces kinases. L'homologie varie entre 26% et 30% et les tailles de ces homologues concordent avec celles de la souris. Le Tableau 3 montre les candidats les plus probables. Compte tenu de l'interaction possible de la kinase PKR avec les structures secondaires des éléments conservés en 3'UTR des ARNm chez *Leishmania* (voir section 1.3.5 Éléments conservés dans le 3'UTR des ARNm), l'étude des eIF2 α kinases sera principalement concentrée sur PKR.

Tableau 3. Homologues de eIF2 α kinases chez *Leishmania*

| eIF2 α kinases (Poids moléculaire ¹) | Homologues chez <i>L. major</i> ² (Poids moléculaire) | Pourcentage d'identité avec les homologues chez la souris (%) |
|--|--|---|
| PKR (515 aa) | LmjF 29.2570 (501 aa) | 30 |
| | LmjF 29.2670 (522 aa) | 26 |
| | LmjF 14.1410 (555 aa) | 28 |
| PERK (1114 aa) | LmjF 34.2150 (1474 aa) | 34 |
| GCN2 (1648 aa) | LmjF 11.0060 (1126 aa) | 26 |
| HRI (619 aa) | LmjF 16.0300 (631 aa) | 26 |

¹ aa : acides aminés chez la souris

²LmjF : *L. major* Friedlin

3.2.2 Caractérisation de l'homologue de la kinase PKR chez *Leishmania*

Des expériences de BLAST effectuées avec la séquence du PKR murin sur le génome de *L. major* et de *L. infantum* (www.GeneDB.org) ont montré que plus d'un homologue du PKR murin existerait chez ces parasites. En effet, la Figure 15 montre les 10 meilleurs scores avec le PKR murin chez *L. major*. De ces 10, il en aurait trois avec un poids moléculaire qui se rapprochent du PKR murin (67 kDa), les LmjF29.2570, LmjF29.2670 et LmjF14.1410 (voir Figure 15). De plus ces trois candidats ont une meilleure conservation des motifs fonctionnels d'une sérine/thréonine kinase de type eIF2 α soit YAIKI et LFIQMEY.

| Sequences producing High-scoring Segment Pairs: | | High Score | Smallest Sum Probability P(N) | N |
|---|---|------------|-------------------------------|---|
| LmjF29.2570 | serine/threonine-protein kinase, putative ... | 299 | 1.1e-25 | 1 |
| LmjF21.1565 | serine/threonine-protein kinase, putative ... | 290 | 4.5e-24 | 1 |
| LmjF29.2670 | serine/threonine-protein kinase Nek3, puta... | 285 | 5.4e-24 | 1 |
| LmjF24.2320 | mitogen-activated protein kinase Leishmani... | 261 | 1.8e-23 | 1 |
| LmjF30.2130 | protein kinase, putative Leishmania major ... | 257 | 9.3e-23 | 2 |
| LmjF18.1080 | PKAC1 protein kinase A catalytic subunit Le... | 253 | 1.3e-22 | 1 |
| LmjF14.1410 | protein kinase, putative Leishmania major ... | 263 | 2.1e-21 | 1 |
| LmjF25.1520 | protein kinase, putative Leishmania major ... | 244 | 3.1e-21 | 2 |
| LmjF17.0790 | protein kinase, putative Leishmania major ... | 260 | 7.9e-21 | 1 |
| LmjF30.1560 | protein kinase, putative Leishmania major ... | 149 | 1.3e-20 | 3 |

Figure 15. Les homologues potentiels de PKR chez *Leishmania*

Des études de BLAST chez *L. major* (www.GeneDB.org) avec le PKR murin ont montré qu'une de ces 3 protéines (en jaune) seraient possiblement l'homologues de cette kinase chez *Leishmania*.

Tableau 4. Homologues de PKR chez *Leishmania*

| Nom sur GeneDB ¹ | Chr | Fonction potentielle | Poids moléculaire ² | Pourcentage d'homologie ³ (%) | Homologie avec les 2 motifs fonctionnels eIF2 α kinases |
|---|-----|--|--------------------------------|--|--|
| LinJ 29.2400 LmjF 29.2570 | 29 | Ser/Thr protein kinase putative | 501 aa (56.2 kDa) | 30 | Y__K_+ _+FI_ME+ |
| LinJ 29.2450 LmjF 29.2670 | 29 | Ser/Thr protein kinase Nek3, putative | 522 aa (57.4 kDa) | 26 | Y_+K++ __I_ME+ |
| Aucun orthologue chez <i>L. infantum</i> LmjF 14.1410 | 14 | Protein kinase, putative | 555 aa (62.2 kDa) | 28 | Y_IK+V L_F_ME+ |

¹ LinJ : *Leishmania donovani infantum*, LmjF : *Leishmania major* Friedlin.

² aa: acides aminés

³ homologie avec le PKR murin.

L'alignement du candidat LmjF 29.2570 avec le PKR de la souris est montré à la Figure 16. L'homologie avec le domaine kinase semble être localisée dans la partie N-terminale de l'homologue chez *Leishmania*. Habituellement, le domaine kinase conservé chez les eIF2 α kinases se trouve dans la partie C-terminale de PKR (voir section 1.4.5.2 PKR). Par contre, chez *Leishmania*, il semble que ce domaine se retrouve en N-terminale. Les deux domaines de liaison à l'ARNdb, qui se trouvent normalement en N-terminale, semblent être absents chez ce parasite. Étonnamment, les acides aminés 240 à 501 possèdent une homologie de 28 % avec le facteur eIF5B qui catalyse l'union des sous unités ribosomales en hydrolysant un GTP. La schématisation des domaines du PKR murin et celui de l'homologue potentiel de *Leishmania* est présentée à la Figure 17. Pour confirmer la présence de PKR chez *Leishmania*, des immunobuvardages avec des anticorps commerciaux dirigés contre le PKR murin ont été effectués.

```
>LmjF29.2570 |||serine/threonine-protein kinase, putative|Leishmania major|chr
29|||Manual
[Full Sequence] [CDS Info]
```

Length = 501

Score = 299 (110.3 bits), Expect = 1.1e-25, P = 1.1e-25
Identities = 83/276 (30%), Positives = 131/276 (47%)

[[HSP Sequence](#)]

```
Query: 238 FNSDFEDIEEIGLGGFGQVFKAKHRIDGKRYAIKRVKY--NTEK----AEHEVQALAE LN 291
      F + + I+ IG G FG+ + ++DGKRY K + T K ++E++ LA ++
Sbjct: 16 FRNKYRQIKSIGKGSFGEAVLVRSKLDGKRYVAKAIDSISMTPKERRDVQNEIRILAAVD 75

Query: 292 HVNIVQYHSCWEGVDYDPEHSMSTDSRYKTRCLFIQMEFCDKGTLEQWMRNRNQS KV--- 348
      H NI++YH EH DT +FI ME+ D G L ++ + V
Sbjct: 76 HPNIIRYH-----EHFEDDT-----LIFIIMEYADGGDLSFRIKEAKKQDVPQP 119

Query: 349 -DKALILDLYEQIVTGVEYIHSKGLIHRDLKPGNIFLVDERHIKIGDFGLATALENDGKS 407
      D L + + QI ++Y+H ++HRDLK NIFL + +K+GDFG++T L+N
Sbjct: 120 FDPNLAMFWFLQICMALKYLHDNHILHRDLKTANIFLTSKNVVKLGDFGISTILQNTMAC 179

Query: 408 RTRRTGTLQYMSPEQLFLKHYGKEVDIFALGLILAELL--HTCFTESEKIKFFESLRKGD 465
      GT Y SPE K Y + D++ALG++ E L H F + + G+
Sbjct: 180 AKTVCGTPYYFSPELCQSKPYNNKSDVWALGVVYFETLTLHRPFAKTLDLLKILAGN 239

Query: 466 FSN--DIFDNKEKSLKLLSEKPKDRPETSEILKT 499
      + + +SL LL RP + IL++
Sbjct: 240 YDPIPTTIPVEMRSLCASLLQVNYMQRPSINRILES 275
```

Figure 16. Alignement de l'homologue putatif de PKR de *Leishmania* avec le PKR murin

L'homologie semble être bien distribuée tout au long de la protéine. Les deux motifs d'une sérine/thréonine kinase semblent être assez bien conservés (en rouge). Par contre, la position des acides aminés identiques ou semblables ne coordonne pas, c'est-à-dire que l'alignement se fait entre la partie N-terminale de l'homologue de PKR de *Leishmania* et la partie C-terminale du PKR murin. On peut aussi remarquer que la lysine essentielle à l'activité kinase de PKR est conservée (l'acide aminé K souligné). De plus, la thréonine impliquée dans l'autophosphorylation de PKR est aussi conservée (l'acide aminé T souligné). Query : PKR murin ; Sbjct : LmjF29.2570.

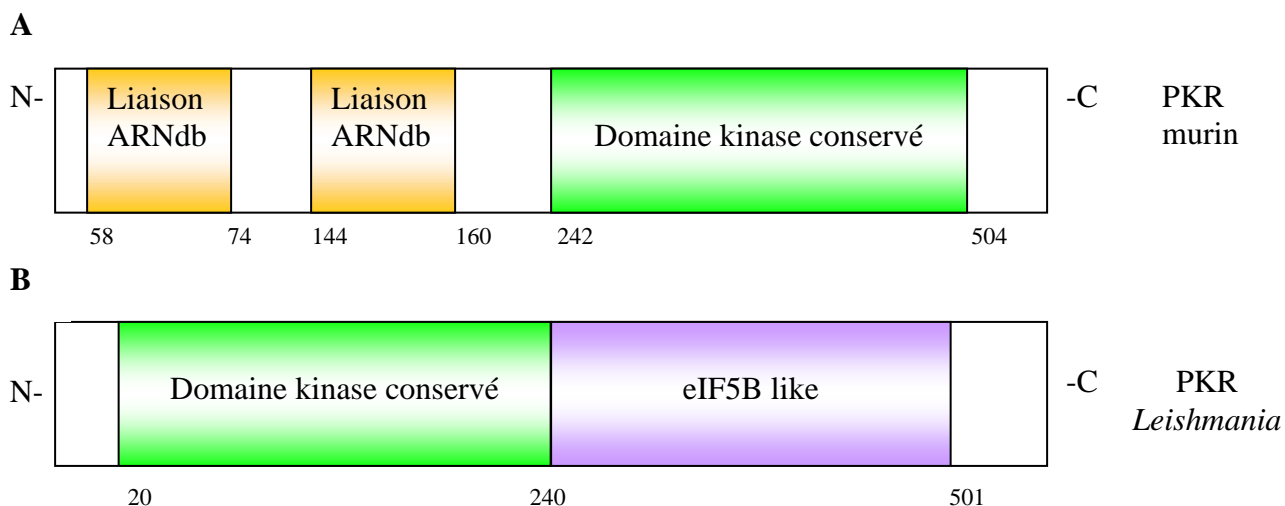


Figure 17. Domaines conservés entre le PKR de la souris et celui de *Leishmania*

Le PKR murin possède deux domaines de liaison à l'ARNdb dans la partie N-terminale (de la position 58 à 74 et de 144 à 160) et le domaine kinase conservé dans la partie C-terminale (position 242-504). L'homologue de PKR chez *Leishmania* possède également ce domaine kinase mais il est localisé dans la partie N-terminale (position 20-240). Dans la partie C-terminale, une homologie de 28% avec le facteur eIF5B a été retrouvée (position 240-501). Ce facteur catalyse l'hydrolyse du GTP et l'union des sous unités ribosomales. Les acides aminés 383 à 393 de l'homologue de PKR chez *Leishmania* possède une homologie avec le 2^e motif de liaison à l'ARNdb du PKR (GDYIAQKKAMV et GNYI.....AQKKLSV).

3.2.3 Expression de l'homologue PKR chez *Leishmania*

Comme pour l'étude du facteur eIF2 α , des immunobuvardages ont été effectuée pour connaître l'expression de l'homologue de PKR chez *Leishmania*. Deux anticorps commerciaux dirigés contre le PKR murin ont été testés et la spécificité est remarquable. Ainsi, les expériences d'immunobuvardages avec des extraits totaux et stressés ont été réalisées. Divers extraits amastigotes (passage un ou deux) ainsi que des extraits de promastigotes à plusieurs phases de la croissance (latence, logarithmique et stationnaire) ou stressés ont été récoltés. Les résultats montrent que les deux anticorps de PKR murin, B10 et D20, reconnaissent une protéine de la même taille que le PKR murin et que l'expression de cette protéine ne varie pas significativement selon le stade du parasite (voir Figure 18A), ni même dans les extraits ayant subis différents stress de pH, de température ou de la drogue thapsigargine (voir Figure 18B). Ce résultat n'exclue pas que l'homologue de PKR soit phosphorylé dans ces conditions de stress, compte tenu que nous avons démontré que le facteur eIF2 α était phosphorylé (voir Figure 14A). En effet, ces stress peuvent activer PKR et le phosphoryler sans affecter son niveau protéique. Bien que les anticorps

commerciaux utilisés reconnaissent une protéine de 67 kDa chez *Leishmania*, nous avons voulu tester si cette eIF2 α kinase avait des propriétés similaires à celles des autres PKR. Pour répondre à cette question, nous avons, dans un premier temps, effectué des immunobuvardages sur les fractions d'un gradient de sucrose pour vérifier si l'homologue de PKR chez *Leishmania* était associé aux ribosomes.

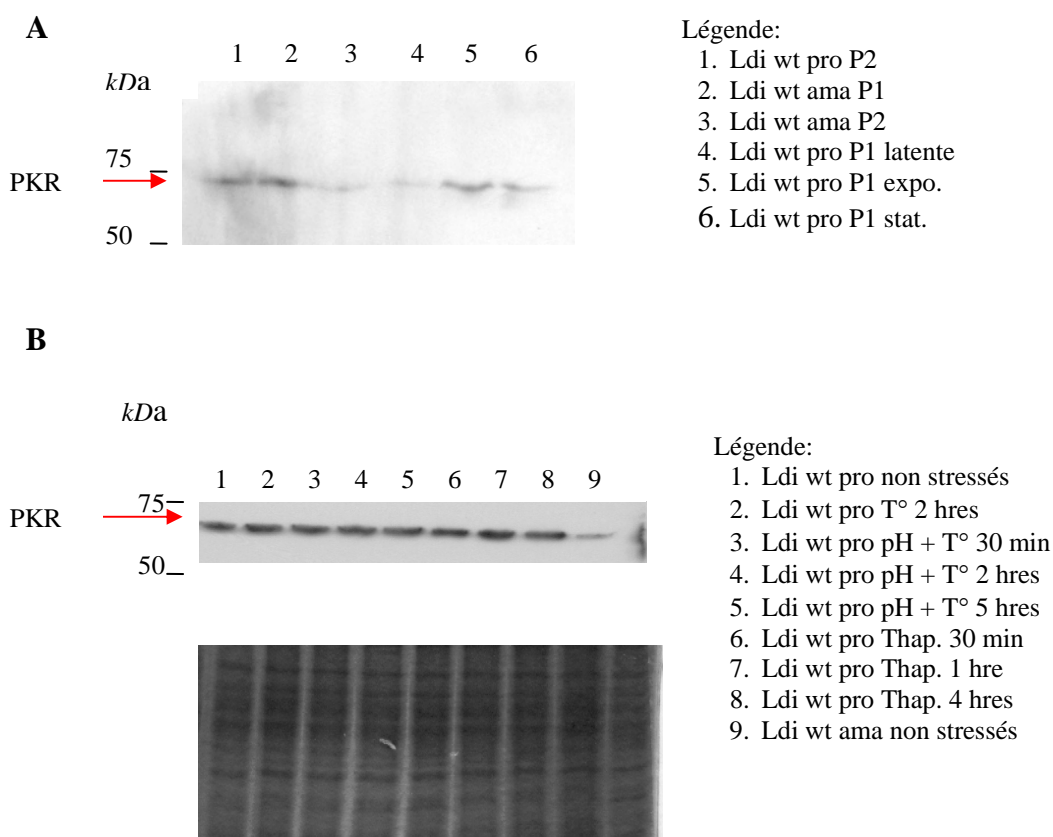


Figure 18. Expression de l'homologue de PKR

(A) L'immunobuvardage anti-PKR (B-10). Cette expérience montre qu'il y a peu de différences dans l'expression de l'homologue de PKR entre les extraits provenant de différents stades de différenciation chez *Leishmania*. (B) Haut : Immunobuvardage anti-PKR (D-20). En utilisant cet anticorps sur les extraits stressés, les résultats indiquent qu'il n'y a aucun effet sur la synthèse protéique de cet homologue reconnu par l'anticorps. Bas : Le gel coloré au bleu de Coomassie.

3.2.4 L'association d'homologue de PKR avec les polysomes

Il serait aussi intéressant de corrélérer la présence de PKR dans les fractions d'un gradient de sucrose avec celle du facteur eIF2 α (voir Figure 13) et ainsi confirmer ce qui a été observé auparavant (Zhu *et al.*, 1997). En effet, la kinase PKR a été localisée dans les premières

fractions d'un gradient de sucrose chez l'humain, associé avec les sous unités ribosomales. Ainsi, de la même manière, un immunobuvardage avec un anticorps anti-PKR (D-20) a été réalisé sur les fractions récoltées d'un gradient de sucrose. L'homologue de PKR de *Leishmania* s'associe majoritairement avec les sous unités ribosomales ainsi que les monosomes chez le promastigote (voir Figure 19). Par contre, sa présence est aussi détectée dans les polysomes légers. Cet homologue reste lié au complexe traductionnel plus longtemps que le facteur eIF2 α . Ceci suggère un rôle plus étendu de ce facteur; il pourrait s'associer à d'autres facteurs d'initiation de la traduction ou même directement à l'ARNm même en l'absence du facteur eIF2 α .

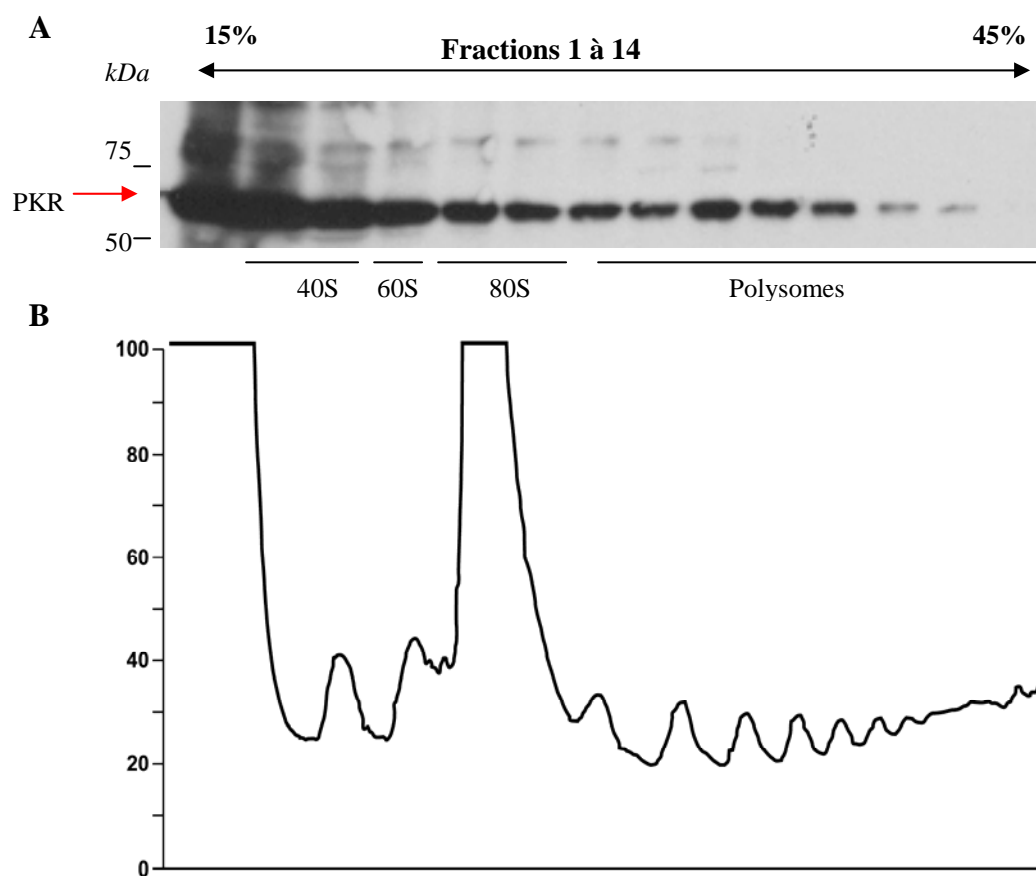


Figure 19. PKR et son association aux ribosomes

(A) **Immunobuvardage anti-PKR (D-20)**. Bien que PKR soit majoritairement associé avec les monosomes, il est aussi retrouvé en moindre partie avec les polysomes légers. PKR reste donc lié plus longtemps au complexe d'initiation de la traduction que le facteur eIF2 α . (B) **Le profil de polyribosomes**.

3.2.5 L'homologue de PKR est phosphorylé spécifiquement au stade amastigote

Bien que l'expression de PKR chez *Leishmania* ne fluctue pas en condition de stress (voir Figure 18B), son niveau de phosphorylation peut varier. Pour répondre à cette question, des essais kinase sur des extraits précipités ont été préférés à l'immunobuvardage à l'aide d'un phospho-anticorps PKR commercial. Par ces expériences, c'est possible de précipiter le complexe protéique qui interagit avec PKR chez *Leishmania*. Une identification du facteur eIF2 α dans ces extraits indiquerait une interaction entre ces deux protéines. Des expériences d'immunoprécipitation ainsi que de liaison à l'ARNdb suivies d'un essai kinase indiquent qu'une protéine d'environ 67 kDa est spécifiquement phosphorylée au stade amastigote (voir Figure 20). Tout comme observé ci-haut (voir section 3.2.3 Expression de l'homologue PKR chez *Leishmania*), les stress de pH, de température et de la drogue thapsigargine ne semblent pas agir ni sur le niveau d'expression et de phosphorylation de PKR. Il est possible de penser que l'inhibition de la synthèse protéique suite à ces stress se réalise via la phosphorylation de eIF2 α par une autre kinase que PKR (la kinase PERK, par exemple).

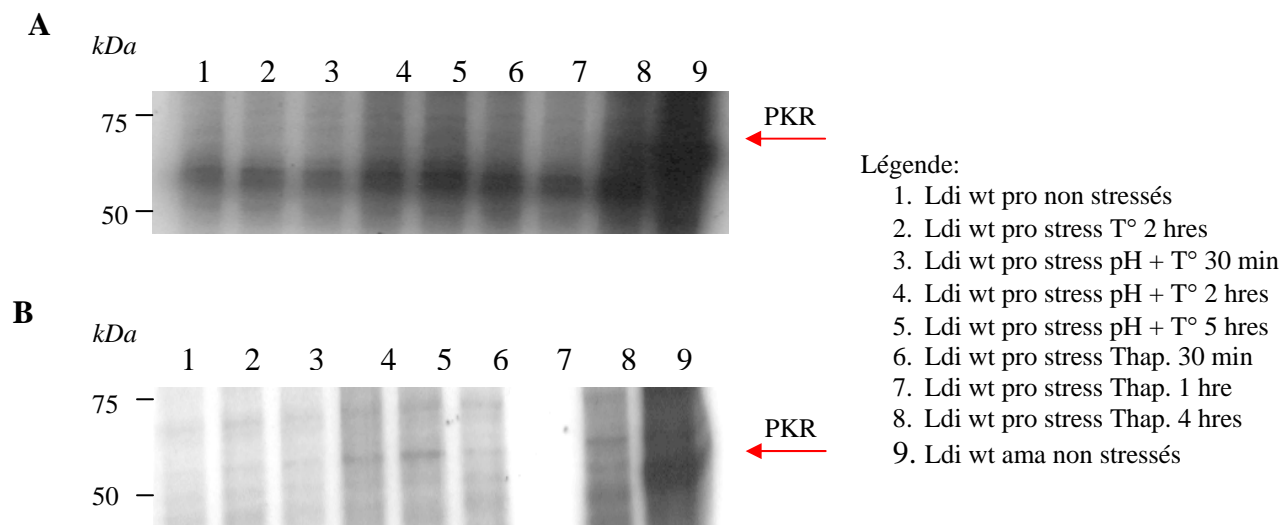


Figure 20. Phosphorylation de l'homologue de PKR dans différentes conditions de stress

(A) **Immunoprécipitation.** Peu de protéines semblent être phosphorylées dans ces conditions de stress. Par contre, une seule bande aux environs de 67 kDa chez les amastigotes est retrouvée sur l'autoradiogramme. La taille correspond au PKR humain et murin, soit de 67 kDa. (B) **Précipitation à l'aide d'ARNdb.** La même bande que précédemment est phosphorylée chez les amastigotes et indique que l'homologue de PKR lie l'ARNdb.

Pour corrélérer avec ces observations, l'expérience a été répétée avec des extraits de parasites non stressés récoltés à différents stades de différenciation en effectuant un immunobuvardage anti-PKR (B-10) au lieu de l'essai kinase. La précipitation à l'aide d'ARNdb n'a précipité l'homologue que chez les amastigotes (voir Figure 21). Il est aussi plus abondant au premier passage par rapport au deuxième. Une corrélation peut être faite à ce point : PKR s'autophosphoryle que lorsqu'il est capable de se lier à l'ARNdb. Il semble qu'il acquiert cette capacité qu'au stade amastigote de *Leishmania*.

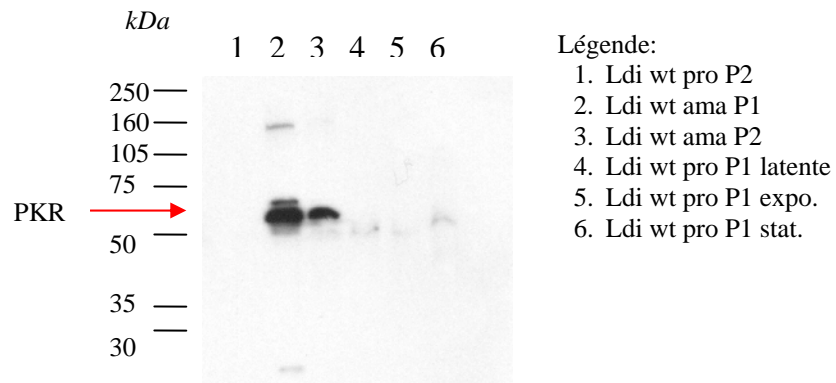


Figure 21. Liaison de PKR à l'ARNdb

Une précipitation à l'aide d'ARNdb suivi d'un immunobuvardage anti-PKR (B-10) a permis d'observer que l'homologue de PKR chez *Leishmania* ne se lie aux billes de poly(rI-rC) qu'au stade amastigote (passage 1 et 2).

4 Discussion et perspectives

La leishmaniose affecte près de 15 millions de personnes à travers le monde et le risque de co-infection avec le VIH augmente sans cesse, sans parler du phénomène de résistance à la drogue de choix, l'antimoine pentavalent. L'étude de l'agent pathogène, le parasite *Leishmania*, devient, alors, de plus en plus importante. Ce parasite doit affronter de multiples stress lors de sa différenciation de promastigote en amastigote : pH, température, stress oxydatif et choc osmotique. Pour survivre, ce parasite exprime distinctement une panoplie de gènes aux deux stades cellulaires. Tous ces gènes, comme toute régulation chez *Leishmania*, sont régulés au niveau post-transcriptionnel. Il semble donc que le parasite a privilégié ce type de régulation, plus rapide et efficace. Notre attention s'est alors portée sur l'initiation de la traduction qui est hautement régulée au stade amastigote (voir section 1.4.1 Initiation de la traduction). De façon générale, les eucaryotes possèdent deux moyens pour faire face aux stress et d'inhiber la traduction générale : soit la phosphorylation du facteur eIF2 α par une des quatre eIF2 α kinases ou soit par la séquestration du facteur eIF4E par 4E-BP. Étant donné qu'il n'y a pas d'homologue de la protéine qui lie eIF4E, 4E-BP, chez *Leishmania*, mes études se sont concentrées sur la régulation du facteur eIF2 α . Il est connu que ce facteur est phosphorylé en condition de stress pour inhiber la traduction (voir section 1.4.4 Facteur d'initiation de la traduction eIF2). Cependant, la traduction de certains transcrits codant pour les protéines impliquées dans la réponse aux stress et dans la survie du parasite peut être augmentée dans ces mêmes conditions.

L'homologie générale entre le eIF2 α de *Leishmania* et celui de la souris est de 46%. De plus, les acides aminés autour du site de phosphorylation sont particulièrement conservés (voir Figure 9), ce qui suggère que les mécanismes de phosphorylation sont possiblement semblables. Quatre kinases phosphorylent ce facteur chez les eucaryotes, chacune activée par divers stress et signaux. La kinase PKR est principalement activée par la présence d'ARNdb mais aussi par des ARN simple brin hautement structurés. Chez *Leishmania*, des éléments conservés ont été identifiés dans le 3'UTR des transcrits amastigote-spécifiques (voir section 1.3.5 Éléments conservés dans le 3'UTR des ARNm). Ces éléments s'assemblent probablement en structures bien définies qui peuvent activer PKR. Cette activation pourrait entraîner sa dimérisation, son autophosphorylation et, par la suite, la

phosphorylation du facteur eIF2 α qui aurait pour effet de diminuer de la synthèse globale de protéines. Il a été démontré dans le laboratoire qu'il y a effectivement une diminution de la traduction après 4 à 5 heures de stress combiné de pH et de température ou de stress de thapsigargine, un agent qui induit un stress du réticulum endoplasmique. Ceci a été observé autant par le profil d'un gradient de sucrose que par des expériences de méthionine marquée au [³⁵S] (résultats non publiés). De façon intéressante, nous avons démontré que dans ces mêmes conditions de stress, le facteur eIF2 α était phosphorylé (voir Figure 14).

4.1 La phosphorylation de eIF2 α en conditions de stress chez *Leishmania*

En utilisant un anticorps spécifique contre la eIF2 α de *Leishmania* produit chez la souris, nous avons pu démontrer que ce facteur est exprimé constitutivement aux deux stades du parasite (voir Figure 12). Une expression continue de ce facteur permet, bien sûr, à *Leishmania* de répondre rapidement au stress lorsqu'il se présente.

Ensuite, à l'aide d'un phospho-anticorps anti-eIF2 α sur des extraits stressés, nous avons démontré que le facteur eIF2 α est phosphorylé suite aux stress (pH, température et thapsigargine) mais aussi au stade amastigote du parasite (voir Figure 14). Les amastigotes vivent dans des conditions de pH acide et de température élevée et se trouvent dans de conditions de stress constants. Étant donné que le facteur eIF2 α est phosphorylé chez *Leishmania* en condition de stress, nous avons voulu étudier les eIF2 α kinases impliquées potentiellement dans cette phosphorylation.

4.2 Un homologue de PKR particulier

Les études de BLAST ont pu montrer qu'il existe des homologues potentiels des quatre eIF2 α kinases chez *Leishmania* (voir Tableau 3). Mes études se sont concentrées sur la kinase PKR compte tenu de son activation par des ARN structurés et de l'interaction possible avec les éléments conservés identifiés dans le 3'UTR des ARNm amastigote-spécifiques. Cette interaction pourrait alors être impliquée dans la survie intracellulaire du parasite. Les Figure 15 et Figure 16 montrent plus en détails les homologues de PKR. Trois

candidats possibles, d'un poids moléculaire près du PKR murin et d'une bonne homologie avec les deux motifs fonctionnels de eIF2 α kinases, ont été identifiés. L'alignement de ces homologues a permis de constater que l'homologie se situe principalement entre la partie N-terminale de la protéine et le domaine kinase conservé en C-terminale du PKR murin. Bien que les résultats de BLAST démontrent que les homologues de PKR chez *Leishmania* ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ARNdb, nos résultats ont montré qu'il est capable de se lier à l'ARNdb. L'homologue de PKR LmjF 29.2570 chez *Leishmania*, malgré qu'il ne possède pas de domaine de liaison à l'ARNdb bien défini, contient une région semblable au facteur eIF5B, impliqué dans l'union des deux sous unités ribosomales et dans l'échange GTP-GDP (voir Figure 17), et une plus faible homologie avec la région de eIF4G qui lie l'ARN. Cette région pourrait peut-être assumer la liaison à l'ARN. Il a été décrit récemment que le PKR d'un poisson zébré possède plutôt un domaine de liaison à l'ADNz (Rothenburg *et al.*, 2005). Ce domaine de liaison lie l'ADN double brin et l'ARN de conformation Z avec, généralement, beaucoup d'affinité quoique la possibilité de lier l'ARNdb n'est pas exclue. Le parasite *Leishmania* possède peut-être aussi un PKR avec des caractéristiques propres à lui.

D'abord, les immunobuvardages avec deux anticorps commerciaux anti-PKR ont montré qu'il y a une protéine de 67 kDa chez *Leishmania* qui est reconnue par ces anticorps. Le niveau d'expression de cette protéine ne varie pas selon le stade du parasite ni même lors de conditions de stress. Puis, les expériences d'essai kinase sur des extraits stressés précipités (voir Figure 20) ont montré que l'homologue de PKR chez *Leishmania* peut être phosphorylé seulement chez les amastigotes. Ce résultat a été obtenu à partir d'extraits immunoprécipités mais aussi suite à une précipitation à l'ARNdb. Ainsi, nous savons que le facteur eIF2 α est également phosphorylé chez les amastigotes. Il est donc possible que PKR soit l'une des kinases qui phosphoryle eIF2 α dans ce stade. Mais il reste la question pourquoi l'homologue de PKR n'est pas phosphorylé en condition de stress de pH, de température et de thapsigargine. Les stress de température et thapsigargine affectent plus particulièrement la conformation des protéines dans le RE. Il est fort probable que la phosphorylation de eIF2 α dans ces conditions soit due à la kinase PERK. Les essais kinases sont fort utiles pour déterminer la phosphorylation d'une protéine, mais les résultats

peuvent être altérés si l'action des phosphatases annule celle des kinases suite aux stress. L'ajout d'inhibiteurs de phosphatases minimise ce phénomène.

Ensuite, nous avons voulu déterminer si l'homologue de PKR chez *Leishmania* peut aussi lier l'ARNdb au stade promastigote. Ainsi, l'immunobuvardage suite à la précipitation avec l'ARNdb sur les extraits de *Leishmania* à différents stades de différenciation montre que l'homologue de PKR est incapable de se lier aux billes de poly(rI-rC), qui mimiquent l'ARNdb, au stade promastigote (voir Figure 21). Ceci peut-être expliqué par le fait que l'homologue de PKR n'est pas phosphorylé au stade promastigote et que la liaison à l'ARNdb demande une phosphorylation préalable dans les extraits récoltés. Il semble donc qu'il y a phosphorylation de cette protéine uniquement lorsqu'il a la capacité de se lier à l'ARNdb, c'est-à-dire au stade amastigote. C'est possible que la présence de certains transcrits amastigote-spécifiques contenant les éléments conservés en 3'UTR puisse activer le PKR chez *Leishmania*.

4.3 Interaction possible entre PKR et eIF2 α

Les gradients de sucrose permettent la séparation et l'isolement des monosomes et des polysomes. Bien que la dégradation des polysomes et la prise des polysomes dans d'autres complexes subcellulaires peuvent affecter les résultats, le profil de polyribosomes obtenu à 254 nm nous en dit long sur la qualité de l'expérience (Davies and Abe, 1995). L'immunobuvardage sur ces fractions indique que tant le facteur eIF2 α que la kinase PKR s'associent préférentiellement aux ribosomes et plus particulièrement aux sous unités 40S et 60S (voir Figure 13 et Figure 19). Ce qui suggère une possible interaction entre les deux protéines. La kinase PKR est aussi associée aux polysomes légers tout comme chez l'humain (Zhu *et al.*, 1997). Il se peut qu'il interagisse avec l'ARNm ou d'autres facteurs de traduction via son domaine particulier en C-terminale. Cette colocalisation avec les sous unités ribosomales suggère fortement qu'il y a une interaction entre ces deux facteurs chez *Leishmania*.

4.4 Perspectives

Il reste encore beaucoup à comprendre sur la régulation de la traduction chez le parasite *Leishmania*. Il faudra, bien sûr, élucider l'identité exacte de cet homologue de PKR chez *Leishmania*, son rôle dans la phosphorylation de eIF2 α ainsi que son mécanisme d'action. La confirmation d'une interaction directe entre ces deux facteurs est, bien sûr, la prochaine étape. Ceci peut être réalisé par l'étude du double hybride ou une identification par spectre de masse dans les extraits précipités. Des expériences sont en route dans notre laboratoire pour identifier le PKR par immunoprécipitation et par spectre de masse (MS/MS). Compte tenu de tout ce qu'il a été découvert, il se peut que le parasite possède des mécanismes nouveaux et inconnus qui pourront servir à l'élaboration de traitements plus efficaces contre la leishmaniose. Le site de phosphorylation de eIF2 α doit aussi être élucidé. Bien que chez la plupart des eucaryotes, le site de phosphorylation soit la S51, des exceptions ont déjà été décrites (Pomar *et al.*, 2003) et il va sans dire que ce soit aussi possible chez *Leishmania*. Comme mentionné, dans le cas de eIF2 α de *Leishmania*, la thréonine en position 185 est un acide aminé potentiel. Le mutant eIF2 α généré par mutagenèse dirigée devra être testé pour sa fonctionnalité avant de poursuivre les expériences. Il serait aussi important d'étudier le mécanisme de phosphorylation de eIF2 α par d'autres kinases. Il a été décrit récemment que la phosphorylation du facteur eIF2 α a comme effet la formation de granules de stress, structures cytosoliques où les ARNm non traduits peuvent être stockés en conditions de stress (Gilks *et al.*, 2004). Nous sommes donc intéressés à étudier la présence possible de ces structures chez *Leishmania*, suite à la phosphorylation de eIF2 α .

Finalement, il ne faut pas oublier que tout événement de phosphorylation est suivi d'un événement de déphosphorylation. Le GADD34 est connu depuis longtemps comme étant le facteur qui active la phosphatase de eIF2 α , PP1c, et son action commence à la fin du stress. Cependant, une équipe a récemment démontré l'existence d'une autre eIF2 α phosphatase, la CreP, qui est constitutivement exprimée. Son inhibition semble être impliquée dans une réponse plus efficace des cellules face aux stress (Jousse *et al.*, 2003). Il reste à déterminer si de tels mécanismes existent chez *Leishmania*.

5 Bibliographie

- Alrajhi, A.A., Ibrahim, E.A., De Vol, E.B., Khairat, M., Faris, R.M. and Maguire, J.H. (2002) Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *N Engl J Med*, **346**, 891-895.
- Argaman, M., Aly, R. and Shapira, M. (1994) Expression of heat shock protein 83 in *Leishmania* is regulated post-transcriptionally. *Mol Biochem Parasitol*, **64**, 95-110.
- Bag, J. (2001) Feedback inhibition of poly(A)-binding protein mRNA translation. A possible mechanism of translation arrest by stalled 40 S ribosomal subunits. *J Biol Chem*, **276**, 47352-47360.
- Baltzis, D., Li, S. and Koromilas, A.E. (2002) Functional characterization of pkr gene products expressed in cells from mice with a targeted deletion of the N terminus or C terminus domain of PKR. *J Biol Chem*, **277**, 38364-38372.
- Baltzis, D., Qu, L.K., Papadopoulou, S., Blais, J.D., Bell, J.C., Sonenberg, N. and Koromilas, A.E. (2004) Resistance to vesicular stomatitis virus infection requires a functional cross talk between the eukaryotic translation initiation factor 2alpha kinases PERK and PKR. *J Virol*, **78**, 12747-12761.
- Bates, E.J., Knuepfer, E. and Smith, D.F. (2000) Poly(A)-binding protein I of *Leishmania*: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1211-1220.
- Berman, J. (2003) Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*, **16**, 397-401.
- Blanchette, J., Racette, N., Faure, R., Siminovitch, K.A. and Olivier, M. (1999) *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *Eur J Immunol*, **29**, 3737-3744.
- Boucher, N., Wu, Y., Dumas, C., Dube, M., Sereno, D., Breton, M. and Papadopoulou, B. (2002) A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem*, **277**, 19511-19520.
- Campbell, D.A., Thomas, S. and Sturm, N.R. (2003) Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect*, **5**, 1231-1240.
- Caron, S., Charon, M., Cramer, E., Sonenberg, N. and Dusanter-Fourt, I. (2004) Selective modification of eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) at the onset of cell differentiation: recruitment of eIF4GII and long-lasting phosphorylation of eIF4E. *Mol Cell Biol*, **24**, 4920-4928.

- Clayton, C.E. (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *Embo J*, **21**, 1881-1888.
- Croft, S.L. and Coombs, G.H. (2003) Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*, **19**, 502-508.
- Cullinan, S.B. and Diehl, J.A. (2004) PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, **279**, 20108-20117.
- Cunningham, A.C. (2002) Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by Leishmania. *Exp and Mol Pathol*, **72**, 132-141.
- Das, A. and Bellofatto, V. (2003) RNA polymerase II-dependent transcription in trypanosomes is associated with a SNAP complex-like transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 80-85.
- Davies, E. and Abe, S. (1995) Methods for isolation and analysis of polyribosomes. *Methods Cell Biol*, **50**, 209-222.
- Davis, A.J., Murray, H.W. and Handman, E. (2004) Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships. *Trends Parasitol*, **20**, 73-76.
- de Haro, C., Mendez, R. and Santoyo, J. (1996) The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis. *Faseb J*, **10**, 1378-1387.
- Deng, J., Lu, P.D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Sonenberg, N., Harding, H.P. and Ron, D. (2004) Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol*, **24**, 10161-10168.
- Descoteaux, A., Turco, S.J., Sacks, D.L. and Matlashewski, G. (1991) Leishmania donovani lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. *J Immunol*, **146**, 2747-2753.
- Dever, T.E. (2002) Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell*, **108**, 545-556.
- Dhalia, R., Reis, C.R., Freire, E.R., Rocha, P.O., Katz, R., Muniz, J.R., Standart, N. and de Melo Neto, O.P. (2005) Translation initiation in Leishmania major: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Mol Biochem Parasitol*, **140**, 23-41.
- Dlugosz, M., Blachut-Okrasinska, E., Bojarska, E., Darzynkiewicz, E. and Antosiewicz, J.M. (2003) Effects of pH on kinetics of binding of mRNA-cap analogs by translation initiation factor eIF4E. *Eur Biophys J*, **31**, 608-616.

- Dumas, C., Muyombwe, A., Roy, G., Matte, C., Ouellette, M., Olivier, M. and Papadopoulou, B. (2003) Recombinant *Leishmania major* secreting biologically active granulocyte-macrophage colony-stimulating factor survives poorly in macrophages in vitro and delays disease development in mice. *Infect Immun*, **71**, 6499-6509.
- Fang, R., Xiong, Y. and Singleton, C.K. (2003) IfkA, a presumptive eIF2 alpha kinase of *Dictyostelium*, is required for proper timing of aggregation and regulation of mound size. *BMC Dev Biol*, **3**, 3.
- Garlapati, S., Dahan, E. and Shapira, M. (1999) Effect of acidic pH on heat shock gene expression in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*, **100**, 95-101.
- 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.
- Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L.M. and Anderson, P. (2004) Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell*, **15**, 5383-5398.
- Gray, N.K. and Wickens, M. (1998) Control of translation initiation in animals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 399-458.
- Guimond, C., Trudel, N., Brochu, C., Marquis, N., El Fadili, A., Peytavi, R., Briand, G., Richard, D., Messier, N., Papadopoulou, B., Corbeil, J., Bergeron, M.G., Legare, D. and Ouellette, M. (2003) Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic Acids Res*, **31**, 5886-5896.
- Gunnery, S. and Mathews, M.B. (1998) RNA binding and modulation of PKR activity. *Methods*, **15**, 189-198.
- Haimeur, A., Brochu, C., Genest, P., Papadopoulou, B. and Ouellette, M. (2000) Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol*, **108**, 131-135.
- Handman, E. (2001) Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev*, **14**, 229-243.
- Herwaldt, B.L. (1999) Leishmaniasis. *Lancet*, **354**, 1191-1199.
- Hotchkiss, T.L., Nerantzakis, G.E., Dills, S.C., Shang, L. and Read, L.K. (1999) *Trypanosoma brucei* poly(A) binding protein I cDNA cloning, expression, and binding to 5 untranslated region sequence elements. *Mol Biochem Parasitol*, **98**, 117-129.

- Inuzuka, T., Yun, B.G., Ishikawa, H., Takahashi, S., Hori, H., Matts, R.L., Ishimori, K. and Morishima, I. (2004) Identification of crucial histidines for heme binding in the N-terminal domain of the heme-regulated eIF2alpha kinase. *J Biol Chem*, **279**, 6778-6782.
- Ishikawa, H., Yun, B.G., Takahashi, S., Hori, H., Matts, R.L., Ishimori, K. and Morishima, I. (2002) NO-induced activation mechanism of the heme-regulated eIF2alpha kinase. *J Am Chem Soc*, **124**, 13696-13697.
- Jiang, H.Y., Wek, S.A., McGrath, B.C., Lu, D., Hai, T., Harding, H.P., Wang, X., Ron, D., Cavener, D.R. and Wek, R.C. (2004) Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol Cell Biol*, **24**, 1365-1377.
- Jiang, H.Y., Wek, S.A., McGrath, B.C., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Cavener, D.R. and Wek, R.C. (2003) Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses. *Mol Cell Biol*, **23**, 5651-5663.
- Joshi, B., Cameron, A. and Jagus, R. (2004) Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur J Biochem*, **271**, 2189-2203.
- Jousse, C., Oyadomari, S., Novoa, I., Lu, P., Zhang, Y., Harding, H.P. and Ron, D. (2003) Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol*, **163**, 767-775.
- Kaempfer, R. (2003) RNA sensors: novel regulators of gene expression. *EMBO Rep*, **4**, 1043-1047.
- Kahvejian, A., Svitkin, Y.V., Sukarieh, R., M'Boutchou M, N. and Sonenberg, N. (2005) Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev*, **19**, 104-113.
- Kazemi, S., Papadopoulou, S., Li, S., Su, Q., Wang, S., Yoshimura, A., Matlashewski, G., Dever, T.E. and Koromilas, A.E. (2004) Control of alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 alpha) phosphorylation by the human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein: implications for eIF2 alpha-dependent gene expression and cell death. *Mol Cell Biol*, **24**, 3415-3429.
- Killick-Kendrick, R. (1990) The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp*, **65 Suppl 1**, 37-42.
- Kozak, M. (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, **234**, 187-208.

- Kozak, M. (2003) Alternative ways to think about mRNA sequences and proteins that appear to promote internal initiation of translation. *Gene*, **318**, 1-23.
- Krishnamoorthy, T., Pavitt, G.D., Zhang, F., Dever, T.E. and Hinnebusch, A.G. (2001) Tight binding of the phosphorylated alpha subunit of initiation factor 2 (eIF2alpha) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. *Mol Cell Biol*, **21**, 5018-5030.
- Kubota, H., Obata, T., Ota, K., Sasaki, T. and Ito, T. (2003) Rapamycin-induced translational derepression of GCN4 mRNA involves a novel mechanism for activation of the eIF2 alpha kinase GCN2. *J Biol Chem*, **278**, 20457-20460.
- Lai, E.C. (2003) RNA sensors and riboswitches: self-regulating messages. *Curr Biol*, **13**, R285-291.
- Lamontagne, J. and Papadopoulou, B. (1999) Developmental regulation of spliced leader RNA gene in *Leishmania donovani* amastigotes is mediated by specific polyadenylation. *J Biol Chem*, **274**, 6602-6609.
- Legare, D., Cayer, S., Singh, A.K., Richard, D., Papadopoulou, B. and Ouellette, M. (2001a) ABC proteins of *Leishmania*. *J Bioenerg Biomembr*, **33**, 469-474.
- Legare, D., Richard, D., Mukhopadhyay, R., Stierhof, Y.D., Rosen, B.P., Haimeur, A., Papadopoulou, B. and Ouellette, M. (2001b) The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem*, **276**, 26301-26307.
- Lewdorowicz, M., Yoffe, Y., Zuberek, J., Jemielity, J., Stepinski, J., Kierzek, R., Stolarski, R., Shapira, M. and Darzynkiewicz, E. (2004) Chemical synthesis and binding activity of the trypanosomatid cap-4 structure. *Rna*, **10**, 1469-1478.
- Lira, R., Sundar, S., Makharia, A., Kenney, R., Gam, A., Saraiva, E. and Sacks, D. (1999) Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis*, **180**, 564-567.
- Liu, C.Y. and Kaufman, R.J. (2003) The unfolded protein response. *J Cell Sci*, **116**, 1861-1862.
- Lu, P.D., Harding, H.P. and Ron, D. (2004a) Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol*, **167**, 27-33.
- Lu, P.D., Jousse, C., Marciniak, S.J., Zhang, Y., Novoa, I., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ron, D. and Harding, H.P. (2004b) Cytoprotection by pre-emptive conditional phosphorylation of translation initiation factor 2. *Embo J*, **23**, 169-179.

- Ma, K., Vattem, K.M. and Wek, R.C. (2002) Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, **277**, 18728-18735.
- Margulis, L., Olendzenski, L., Dolan, M. and MacIntyre, F. (1996) Diversity of eukaryotic microorganisms: computer-based resources, "The Handbook of Protoctista" and its "Glossary". *Microbiologia*, **12**, 29-42.
- Martinez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K. and Myler, P.J. (2004) Transcription initiation and termination on Leishmania major chromosome 3. *Eukaryot Cell*, **3**, 506-517.
- Martinez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K. and Myler, P.J. (2003) Transcription of Leishmania major Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell*, **11**, 1291-1299.
- Mazumder, B., Seshadri, V. and Fox, P.L. (2003) Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci*, **28**, 91-98.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S. and Pesole, G. (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol*, **3**, REVIEWS0004.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P. and Ron, D. (2001) Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol*, **153**, 1011-1022.
- Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H.P. and Ron, D. (2003) Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *Embo J*, **22**, 1180-1187.
- Ouellette, M., Drummelsmith, J. and Papadopoulou, B. (2004) Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat*, **7**, 257-266.
- Ouellette, M., Legare, D. and Papadopoulou, B. (2001) Multidrug resistance and ABC transporters in parasitic protozoa. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **3**, 201-206.
- Ouellette, M., Olivier, M., Sato, S. and Papadopoulou, B. (2003) [Studies on the parasite Leishmania in the post-genomic era]. *Med Sci (Paris)*, **19**, 900-909.
- Ouellette, M. and Papadopoulou, B. (1993) Mechanisms of drug resistance in Leishmania. *Parasitol Today*, **9**, 150-153.
- Papadopoulou, B., Boucher, N., McNicoll, F., Wu, Y., Dube, M., El Fakhry, Y. and Huang, H.F. (2003a) Translational Control of Stage-specific Gene Expression in the Intracellular Form of Leishmania. *J of Parasitol*, **89(suppl.)**, S174-S181.

- Papadopoulou, B., Huang, X.F., Boucher, N. and McNicoll, F. (2003b) Stage-specific regulation of gene expression in Leishmania: Life from sandfly vector to man. *ASM News*, **69**, 282-288.
- Papadopoulou, B., Roy, G. and Ouellette, M. (1992) A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of Leishmania. *Embo J*, **11**, 3601-3608.
- Papadopoulou, G., Karagouni, E. and Dotsika, E. (1998) ISCOMs vaccine against experimental leishmaniasis. *Vaccine*, **16**, 885-892.
- Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Lomakin, I.B., Pilipenko, E.V., Shatsky, I.N., Agol, V.I. and Hellen, C.U. (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7029-7036.
- Pomar, N., Berlanga, J.J., Campuzano, S., Hernandez, G., Elias, M. and de Haro, C. (2003) Functional characterization of Drosophila melanogaster PERK eukaryotic initiation factor 2alpha (eIF2alpha) kinase. *Eur J Biochem*, **270**, 293-306.
- Rafie-Kolpin, M., Han, A.P. and Chen, J.J. (2003) Autophosphorylation of threonine 485 in the activation loop is essential for attaining eIF2alpha kinase activity of HRI. *Biochemistry*, **42**, 6536-6544.
- Requena, J.M., Quijada, L., Soto, M. and Alonso, C. (2003) Conserved nucleotides surrounding the trans-splicing acceptor site and the translation initiation codon in Leishmania genes. *Exp Parasitol*, **103**, 78-81.
- Rochette, A., McNicoll, F., Girard, J., Breton, M., Leblanc, E., Bergeron, M.G. and Papadopoulou, B. (2005) Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in Leishmania spp. *Mol Biochem Parasitol*, **140**, 205-220.
- Rom, E., Kim, H.C., Gingras, A.C., Marcotrigiano, J., Favre, D., Olsen, H., Burley, S.K. and Sonenberg, N. (1998) Cloning and characterization of 4EHP, a novel mammalian eIF4E-related cap-binding protein. *J Biol Chem*, **273**, 13104-13109.
- Ron, D. (2002) Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest*, **110**, 1383-1388.
- Rothenburg, S., Deigendesch, N., Dittmar, K., Koch-Nolte, F., Haag, F., Lowenhaupt, K. and Rich, A. (2005) A PKR-like eukaryotic initiation factor 2{alpha} kinase from zebrafish contains Z-DNA binding domains instead of dsRNA binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1602-1607.
- Saar, Y., Ransford, A., Waldman, E., Mazareb, S., Amin-Spector, S., Plumblee, J., Turco, S.J. and Zilberstein, D. (1998) Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of Leishmania donovani. *Mol Biochem Parasitol*, **95**, 9-20.

- Salotra, P., Ralhan, R. and Sreenivas, G. (2000) Heat-stress induced modulation of protein phosphorylation in virulent promastigotes of *Leishmania donovani*. *Int J Biochem Cell Biol*, **32**, 309-316.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.
- Saunders, L.R. and Barber, G.N. (2003) The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *Faseb J*, **17**, 961-983.
- Scheper, G.C. and Proud, C.G. (2002) Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur J Biochem*, **269**, 5350-5359.
- Sereno, D. and Lemesre, J.L. (1997) Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**, 972-976.
- Sharma, K., Chandra, H., Gupta, P.K., Pathak, M., Narayan, A., Meena, L.S., D'Souza, R.C., Chopra, P., Ramachandran, S. and Singh, Y. (2004) PknH, a transmembrane Hank's type serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis* is differentially expressed under stress conditions. *FEMS Microbiol Lett*, **233**, 107-113.
- Shen, X., Zhang, K. and Kaufman, R.J. (2004) The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat*, **28**, 79-92.
- Siddiqui, N., Kozlov, G., D'Orso, I., Trempe, J.F. and Gehring, K. (2003) Solution structure of the C-terminal domain from poly(A)-binding protein in *Trypanosoma cruzi*: a vegetal PABC domain. *Protein Sci*, **12**, 1925-1933.
- Singh, A.K., Papadopoulou, B. and Ouellette, M. (2001) Gene amplification in amphotericin B-resistant *Leishmania tarentolae*. *Exp Parasitol*, **99**, 141-147.
- Sonenberg, N. and Dever, T.E. (2003) Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol*, **13**, 56-63.
- Strudwick, S. and Borden, K.L. (2002) The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation*, **70**, 10-22.
- Sullivan, W.J., Jr., Narasimhan, J., Bhatti, M.M. and Wek, R.C. (2004) Parasite-specific eIF2 (eukaryotic initiation factor-2) kinase required for stress-induced translation control. *Biochem J*, **380**, 523-531.
- Tamar, S., Dumas, C. and Papadopoulou, B. (2000) Chromosome structure and sequence organization between pathogenic and non-pathogenic *Leishmania* spp. *Mol Biochem Parasitol*, **111**, 401-414.

- Tomoo, K., Shen, X., Okabe, K., Nozoe, Y., Fukuhara, S., Morino, S., Sasaki, M., Taniguchi, T., Miyagawa, H., Kitamura, K., Miura, K. and Ishida, T. (2003) Structural features of human initiation factor 4E, studied by X-ray crystal analyses and molecular dynamics simulations. *J Mol Biol*, **328**, 365-383.
- Topisirovic, I., Ruiz-Gutierrez, M. and Borden, K.L. (2004) Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. *Cancer Res*, **64**, 8639-8642.
- Vieira, L.L., Sacerdoti-Sierra, N. and Jaffe, C.L. (2002) Effect of pH and temperature on protein kinase release by *Leishmania donovani*. *Int J Parasitol*, **32**, 1085-1093.
- Wang, X. and Grumet, R. (2004) Identification and characterization of proteins that interact with the carboxy terminus of poly(A)-binding protein and inhibit translation in vitro. *Plant Mol Biol*, **54**, 85-98.
- Wilkie, G.S., Dickson, K.S. and Gray, N.K. (2003) Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci*, **28**, 182-188.
- 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.
- Wong, A.H., Durbin, J.E., Li, S., Dever, T.E., Decker, T. and Koromilas, A.E. (2001) Enhanced antiviral and antiproliferative properties of a STAT1 mutant unable to interact with the protein kinase PKR. *J Biol Chem*, **276**, 13727-13737.
- Wu, Y., El Fakhry, Y., Sereno, D., Tamar, S. and Papadopoulou, B. (2000) A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol Biochem Parasitol*, **110**, 345-357.
- Yoffe, Y., Zuberek, J., Lewdorowicz, M., Zeira, Z., Keasar, C., Orr-Dahan, I., Jankowska-Anyszka, M., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E. and Shapira, M. (2004) Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*. *Rna*, **10**, 1764-1775.
- Zeiner, G.M., Sturm, N.R. and Campbell, D.A. (2003) The *Leishmania tarentolae* spliced leader contains determinants for association with polysomes. *J Biol Chem*, **278**, 38269-38275.
- Zhang, P., McGrath, B.C., Reinert, J., Olsen, D.S., Lei, L., Gill, S., Wek, S.A., Vattem, K.M., Wek, R.C., Kimball, S.R., Jefferson, L.S. and Cavener, D.R. (2002) The GCN2 eIF2 α kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. *Mol Cell Biol*, **22**, 6681-6688.

- Zhao, C., Papadopoulou, B. and Tremblay, M.J. (2004a) Leishmania infantum enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network. *Clin Immunol*, **113**, 81-88.
- Zhao, C., Papadopoulou, B. and Tremblay, M.J. (2004b) Leishmania infantum promotes replication of HIV type 1 in human lymphoid tissue cultured ex vivo by inducing secretion of the proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1 alpha. *J Immunol*, **172**, 3086-3093.
- Zhu, S., Romano, P.R. and Wek, R.C. (1997) Ribosome targeting of PKR is mediated by two double-stranded RNA-binding domains and facilitates in vivo phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2. *J Biol Chem*, **272**, 14434-14441.
- Zhu, S., Sobolev, A.Y. and Wek, R.C. (1996) Histidyl-tRNA synthetase-related sequences in GCN2 protein kinase regulate in vitro phosphorylation of eIF-2. *J Biol Chem*, **271**, 24989-24994.
- Zilberstein, D. and Shapira, M. (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. *Annu Rev Microbiol*, **48**, 449-470.
- Zilka, A., Garlapati, S., Dahan, E., Yaolsky, V. and Shapira, M. (2001) Developmental regulation of heat shock protein 83 in Leishmania. 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem*, **276**, 47922-47929.

