

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE – ALGER

**PROJET DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE**

LE GENOME LEISHMANIEN KINETOPLASTIQUE

Présenté par : BOUHADJAR Adnane
Soutenu le 29/06/2007

Le jury :

Président	Melle. BOUKHORS, K	Maître de conférences	ENV. Alger
Promoteur	Melle. AIT OUDHIA, Kh	Chargée de cours	ENV. Alger
Examineur	Melle GHALMI, F	Chargée de cours	ENV. Alger
Examineur	Melle TENNAH, S	Chargée de cours	ENV. Alger
Examineur	Melle SMAI, A	Chargée de cours	ENV. Alger

Année universitaire : 2007/2008

REMERCIEMENT

A Mademoiselle AIT OUDHIA Khatima,
Qui m'a proposé ce travail et m'a aidé dans sa réalisation
Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance et mon profond respect.

A Melle BOUKHORS KARIMA,
Qui m'a fait l'honneur de présider notre jury,
Hommage respectueux

A Mesdames GHALMI Farida, TENNAH Safia et SMAI Amina,
Qui se sont intéressées à ce travail,
ET qui me font l'honneur de participer à notre jury,
Sincères remerciements.

DEDICACES

A mes précieux parents,

Pour votre amour,

En témoignage de mon infinie reconnaissance.

A mes sœurs, et à mes frères adorés.

A toute ma famille.

A Monsieur TOUDJINE Malik,

Qui m'a permis de découvrir cette profession,

BOUHADJAR Adnane

Résumé

Le génome est un ensemble de matériel génétique, dont l'unité fonctionnelle est représentée par l'ADN. Toute modification de ce dernier, peut entraîner des changements assez impressionnants dans l'expression clinique d'une pathologie donnée.

Dans le cas de la leishmaniose, le parasite responsable doit s'adapter à des conditions de vie différentes, son passage du vecteur à l'hôte, ou de l'hôte au vecteur, va entraîner des reprogrammations génétiques, provoquant ainsi des dysfonctionnements, à l'origine de certaines mutations génétiques et donc de nouvelles expressions cliniques de la pathologie.

Abstract

The genome is a set of genetic material, whose unit is represented by DNA. Any modification of this last, may lead (pull) to changes quite impressive in the clinical expression of a given pathology.

In the case of the leishmaniasis, the responsible parasite has to adapt himself to different living conditions, his passage from vector to host, or from host to vector, is going to pull genetic reprogrammations, so provoking dysfunctions, at the origin of certain genetic alterations ; so ; new clinical expressions of the pathology.

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Aspect général de la molécule ADN	08
Figure 2	Organisation du kinetoplaste	10
Figure 3	Organisation d'un minicercle	10
Figure 4	ADN satellite	11
Figure 5	Caryogramme complet de deux souches de <i>Leishmania</i> (A), Le caryotype de la souche Friedlin (B)	13
Figure 6	Séquençage complémentaire de l'acide désoxyribonucléique (ADNc)	14
Figure 7.	Organisation génique et maturation des messagers chez <i>Leishmania</i>.	16
Figure 8	Utilisation de puces portant des ADNc ou oliginucléotides	18
Figure 9	Expression différentielle des protéines de <i>Leishmania</i>	20

Liste des Abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
SRH	système réticulo-Histiocytaire
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase chain reaction)
(A)	Adénine
(G)	Guanine
(C)	Cytosine
(T)	Thymine
kb	Kilo base
pb	Paire de base
EST	Expressed Sequence Tags
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messager
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
°C	Degré celcius

SOMMAIRE

	Page
REMERCIEMENTS	I
DEDICACES	II
RESUME	III
LISTE DES FIGURES	IV
LISTE DES ABREVIATIONS	V
SOMMAIRE	VI

INTRODUCTION	1
--------------	---

CHAPITRE I «GENERALITES SUR LE PARASITE *LEISHMANIA* »

I. 1.	LES ELEMENTS DU CYCLE BIOLOGIQUE	3
I. 1. 1.	LE PARASITE	3
I. 1. 2.	LE VECTEUR	3
I. 1. 3.	LE RESERVOIR	4
I. 2.	LE CYCLE EVOLUTIF	4
I. 3.	LA MALADIE	5
I. 4.	DIAGNOSTIC ET DETECTION DU PARASITE	6

CHAPITRE II « LE GENOME *LEISHMANIA* »

II. 1.	L'ADN	8
II. 2.	GENOME KINETOPLASTIQUE	9
II. 3.	CARACTERISTIQUES DU GENOME KINETOPLASTIQUE	11
II. 3. 1.	LA TAILLE DU GENOME	11
II. 3. 2.	SEQUENCES GENIQUES	11

II. 3. 3.	NOMBRE DE GENES	12
II. 3. 4.	PLOÏDIE	12
II. 4.	ORGANISATION DU GENOME <i>LEISHMANIA</i>	12
II. 4. 1.	CARYOTYPE MOLECULAIRE DE <i>LEISHMANIA</i>	13
II. 4. 2.	IDENTIFICATION DES CHROMOSOMES	14
II. 5.	MODE DE REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES	15

CHAPITRE III

« DIFFERENTIATION GENOMIQUE DU PARASITE »

III. 1.	DIFFERENCIATION DU PARASITE	17
III. 1. 1.	<i>IN VIVO</i>	17
III. 1. 2.	LA CULTURE <i>IN VITRO</i> DU PARASITE	17
III. 2.	ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE	18
III. 2. 1.	DEFINITION DU TRANSCRIPTOME	18
III. 2. 2.	ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DU GENOME LEISHMANIEN	18
III. 2. 3.	TECHNIQUE DES PUCES A ADN.	18
III. 3.	ANALYSE PROTEOMIQUE	20
III. 3. 1.	DEFINITION DU PROTEOME	20
III. 3. 2.	METHODE DE RECHERCHE EN PROTEOMIQUE	20
III. 3. 3.	AVANTAGES DES ANALYSES PROTEOMIQUES	21
III. 3. 3.	LES OBSTACLES RENCONTRES LORS DE L'ANALYSE PROTEOMIQUE	22
III. 3. 4.	GENOMIQUE COMPARATIVE	22
III. 4.	CHIMIORESISTANCE	23
	CONCLUSION	24
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	25

INTRODUCTION

Le génome est un ensemble de matériel génétique, constitué d'ADN, molécule qui comprend dans l'enchaînement linéaire de sa séquence en nucléotides la totalité de l'information biochimique, indispensable à la vie.

Pour une espèce donnée, le génome est globalement semblable pour tous les individus. Il existe cependant des variations entre génomes d'individus différents : c'est le polymorphisme. Ce polymorphisme peut être silencieux, ou peut se manifester par la modification d'un caractère observable. Parfois, il peut induire un dysfonctionnement grave (mutation génétique) (BERNOT, 2001)

L'unité fonctionnelle du génome est l'ADN, et toute modification de ce dernier, peut entraîner des changements assez impressionnants dans l'expression clinique d'une pathologie.

Au cours de son cycle, *Leishmania* est astreint à de perpétuelles adaptations aux conditions de vie chez ses hôtes successifs (DEDET, 1999). Ces éternelles adaptations nécessitent plusieurs reprogrammations des différents gènes exprimés, d'où l'importance de bien comprendre les mécanismes qui permettent cette régulation. (LEWIN, 1998)

Le parasite du genre *Leishmania* est, selon les espèces, responsable de différentes pathologies et représente une cause importante de morbidité et de mortalité en médecine humaine et vétérinaire. Ce parasite intracellulaire est transmis par l'intermédiaire d'un phlébotome femelle chez un hôte vertébré, où, après différenciation, il se multiplie dans les macrophages.

L'absence de vaccins et les difficultés liées au contrôle du vecteur du parasite font que la seule approche thérapeutique repose actuellement sur la chimiothérapie. Les molécules utilisées de nos jours possèdent cependant de nombreuses limitations de par leur coût et leur toxicité, mais aussi de par l'émergence de phénomènes de résistance à travers le monde,

Trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour développer des nouveaux médicaments est donc crucial pour ces parasitoses que l'Organisation mondiale de la santé

(OMS) classe désormais parmi **les infections prioritaires (catégorie 1 : infections ré-émergentes et incontrôlées)**.

Classiquement, les approches utilisées pour caractériser de nouvelles molécules à activité antiparasitaire reposent sur des approches empiriques qui consistent à cribler l'activité de molécules naturelles ou synthétiques sur la viabilité du parasite in vitro. Les progrès récents en génomique et en protéomique ont revitalisé la recherche en microbiologie et parasitologie.

Les outils moléculaires disponibles aujourd'hui permettent désormais d'identifier des gènes parasitaires à partir desquels des molécules spécifiques seront synthétisées pour inhiber l'action biologique de leurs produits.

La connaissance du génome leishmanien s'avère une source inestimable pour des études transcriptomiques et protéomiques qui permettent de mieux comprendre le processus de différenciation du parasite, et sa capacité à résister aux traitements conventionnels.

D'où l'objectif de cette étude bibliographique, qui est de contribuer à la compréhension de la structure du génome leishmanien (Chapitre II), et de son rôle dans le processus de différenciation de ce parasite (Chapitre III), bien sûr après avoir donné quelques généralités sur les éléments du cycle biologique du parasite *Leishmania* et un petit rappel sur la maladie engendrée par ce dernier (Chapitre I).

Chapitre I

« GENERALITES
SUR LE PARASITE
LEISHMANIA »

I. 1. LES ELEMENTS DU CYCLE BIOLOGIQUE

Il s'agit d'un cycle hétéroxène comprenant un agent pathogène, un vecteur et un réservoir.

I. 1. 1. LE PARASITE

Leishmania est un protozoaire flagellé appartenant à l'ordre des kinetoplastida. Il a deux hôtes obligatoires : un vertébré mammifère et un invertébré insecte hématophage.

Morphologiquement toutes les espèces sont identiques, les parasites se présentent à leur hôtes successifs sous deux stades morphologiques : promastigote et amastigote.

Chez l'insecte vecteur, la forme promastigote présente un corps plus ou moins fuselé, prolongée par un flagelle à la partie antérieure. Ce sont des parasites extracellulaires, mobiles, vivant dans le tube digestif de l'insecte.

Chez les mammifère, la forme amastigote a un aspect globuleux légèrement ovalaire, et son flagelle ne dépasse pas le corps cellulaire. Il s'agit d'une forme intracellulaire, qui parasite les cellules du système réticulo-Histiocytaire (SRH).

La taxonomie du genre *Leishmania* a subi plusieurs modifications. Les critères d'identification sont devenus fiables avec l'introduction de l'analyse isoenzymatique, (DEDET et al, 1999).

Leishmania comme tous les Kinetoplastide, possède deux génomes, l'un kinétoplastique et l'autre nucléaire. Le kinetoplaste se compose d'un réseau complexe de molécules d'ADN circulaires représentés par des maxi et des minicercles (SIMPSON, 1987).

I. 1. 2. LE VECTEUR

Le vecteur des leishmanioses est un insecte qui multiplie, transporte et inocule la forme infectante du parasite. Ce sont des insectes Diptères Nématocères de la famille des Psychodidés. De petite taille, ils présentent un corps velu, courbé au niveau du thorax, avec des ailes lancéolées. (KILLICK-KENDRIK et KILLICK-KENDRIK, 1999).

Seules les femelles sont hématophages. Leur période d'activité d'étaie de Mai à Octobre (RIOUX et al, 1967). Les phlébotomes sont largement répandus dans le monde

partout où règne une température assez élevée pour leur permettre d'entrer en activité, au moins pendant une partie de l'année.

Le stimulus qui provoque l'oviposition chez le phlébotome est le contact avec une surface humide, leurs œufs se développent ensuite en larves sur le sol, dans les terriers, les nids, des rochers, de vieux murs ou les tas de débris végétaux, puis se transforment en pupes et enfin en imago (DEDET et al, 1999).

Chez l'homme ce sont les parties découvertes qui sont exposées aux piqûres (visage, cou, mains et pieds), chez les animaux, ce sont les zones les moins velues (museau, oreilles). La piqûre est douloureuse, mais l'intensité des réactions de l'hôte varie selon l'espèce de phlébotomes en cause (douleur, apparition d'une papule ou d'une tache hémorragique) (KILLICK-KENDRIK et KILLICK-KENDRIK, 1999).

I. 1. 3. LE RESERVOIR

Les leishmanioses sévissent dans les foyers endémiques, lorsque coexistent le mammifère-réservoir et l'insecte-vecteur, nécessaires au développement du protozoaire parasite (DEREURE, 1993).

Les rongeurs ont un rôle considérable à jouer dans l'entretien des leishmanioses cutanées de l'ancien et du nouveau monde.

Les carnivores quant à eux assurent le maintien de la leishmaniose viscérale dans le monde entier, qu'ils soient sauvages (renard), ou domestiques (chien). Ce dernier est considéré comme principal réservoir de la leishmaniose viscérale méditerranéenne (ASHFORD, 2000)

I. 2. LE CYCLE EVOLUTIF

Le cycle des leishmanioses est un cycle hétéroxène présentant deux hôtes, un hôte invertébré (phlébotome) et un hôte vertébré (homme, chien, renard...)

C'est au cours du repas sanguin le phlébotome absorbe les leishmanies sous la forme **amastigote**, parasite intracellulaire du système réticulo-histiocytaire du sang des vertébrés. Les amastigotes vont se multiplier et rapidement se différencier en promastigote à l'intérieur de tube digestif de l'insecte vecteur.

Les promastigotes migrent ensuite à la partie antérieure du tube digestif puis gagnent les pièces buccales. La durée du cycle chez le phlébotome est de 4-7 jours suivant la température. (KILLICK-KENDRIK, 1979).

Le vecteur peut alors transmettre le parasite à un animal ou à l'homme. Les promastigotes injectés seront transformés en amastigotes lors de leur passage en **phagolysosome**, dans lesquels ils se multiplient entraînant la lyse cellulaire successive des macrophages du sang ou de la peau de l'hôte vertébré (DEDET, 2001). Les phlébotomes infectés ont des difficultés à prendre leur repas sanguin de façon continue, ce qui peut être un facteur de multiplication des piqûres et donc d'augmentation de transmission.

I. 3. LA MALADIE

Des études portant sur des chiens soumis à des conditions d'infestation en milieu naturel ont permis de démontrer que l'affection débute par un chancre d'inoculation, déjà suspecté en 1932 par ALDER et THEODOR (DEREURE, 1999). Celui-ci siège au niveau de la truffe, du chanfrein ou de la face interne de l'oreille. Les lésions peuvent être uniques ou multiples et surviennent de un à six mois après la fin de la période d'activité des phlébotomes vecteurs, avec un maximum au troisième mois. La durée d'évolution de ces lésions est de trois à neuf mois.

Il a été constaté que certains chiens, bien qu'ayant présenté un chancre d'inoculation, confirmé parasitologiquement, ne présentent pas de signes, ni cliniques ni sérologiques, de leishmaniose viscérale. Il pourrait s'agir soit de cas de résistance spontanée de l'animal, soit de formes infra-cliniques déjà mentionnées par certains auteurs (DEDET, 2001).

Les signes cliniques de la leishmaniose canine ont déjà été décrits de longue date (Tableau 01). Les signes majeurs de l'affection canine sont à la fois généraux et cutanés. Au plan général, le chien leishmanien présente un amaigrissement généralisé bien que l'appétit soit conservé, responsable d'un état d'asthénie et de faiblesse. L'amyotrophie est particulièrement marquée au niveau de la face, donnant à l'animal un aspect sénile, atonique et triste. L'hyperthermie est aussi présente et se manifeste par une polydipsie.

Au niveau des organes profonds, hépato-splénomégalie et adénopathies sont fréquentes. Les signes cutanées sont nombreux : hyperkératose, dépigmentation et dépilation (signe des lunettes), mais pouvant également intéresser d'autres régions du corps (bord des oreilles, l'arrière train, queue...). L'onychogryphose est un signe très fréquemment retrouvé. Des ulcérations des muqueuses nasales, associées à la thrombopénie, sont responsables d'épistaxis. Les lésions de l'œil affectant les paupières (granulomes), la conjonctive (hyperhémie), la cornée (kératite), l'uvéa (uvéite) ainsi que la rétine (choriorétine), sont généralement associées au tableau clinique (DEDET, 1999).

Il convient de signaler que tous les signes mentionnés précédemment peuvent être absents, même chez les chiens présentant une leishmaniose évolutive. Il semblerait en particulier qu'une issue rapidement fatale soit plus souvent la règle chez ces animaux ne présentant pas les signes habituels de l'affection.

En résumé, l'expression clinique est la conséquence directe du statut immunitaire, elle dépend en particulier des interactions entre les *Leishmania* d'une part et les cellules immunitaires d'autre part.

I. 4. DIAGNOSTIC ET DETECTION DU PARASITE

Le diagnostic clinique de la leishmaniose, repose sur un tableau clinique pas très caractéristique et sur d'importantes notions épidémiologiques. En général, à lui seul, il est insuffisant, d'où l'intérêt d'utiliser des tests sérologiques, afin de rechercher des anticorps spécifiques. Il existe un grand nombre de tests sérologiques, dont certains sont spécifiquement élaborés pour le chien.

La mise en évidence directe du parasite reste le test le plus sûr, que ce soit par coloration de frottis (sang, moelle osseuse...), par la mise en culture de ces prélèvements dans des milieux spéciaux, l'utilisation, par inoculation aux animaux de laboratoire (PRATLONG, 1985)

L'avènement et la généralisation des techniques de biologie moléculaire ont conduit au concept de diagnostic moléculaire. Ces techniques sont basées sur la détection,

éventuellement l'amplification et l'analyse, des acides nucléiques du parasite dans divers prélèvements. Le diagnostic moléculaire des leishmanies vient compléter les approches parasitologiques et sérologiques classiques dans le cadre du diagnostic initial de la maladie. Mais ses excellentes performances ont ouvert de nouveaux champs d'investigation au niveau du suivi post-thérapeutique, du typage des isolats et de l'étude des sujets porteurs asymptomatiques du parasite.

Tableau 01 : Examens complémentaires réalisable face à une suspicion de leishmaniose canine (DEREURE, 1999)

Examens indirects	Spécimens	Critères diagnostiques
- Biochimie classique	- Sérum ou plasma	- Urémie et créatinémie augmentées ; - Activité des enzymes hépatiques augmentée ; - Hyperprotéinémie.
	- Urine	- Protéinurie ; - Hématurie ;
- Électrophorèse	- Sérum	- Hypergammaglobulinémie : gammopathie polyclonale (rarement monoclonale) avec parfois une augmentation des B2 et bioc By ; - Hypoalbuminémie
- Numération et formule sanguine	- Sang EDTA	- Anémie hypo à arégénérative ; - Thrombocytopénie ; - Leucopénie ou leucocytose avec déviation à gauche de la courbe d'Armeth ; - Lymphopénie - Monocytose
- Sérologie	- Sérum ou plasma	- Titre en anticorps supérieur à 1/80 ^e par immunofluorescence ou supérieur à 50 par ELISA (selon le laboratoire).
Examens directs	Spécimens	Diagnostic de certitude
- Examen microscopique après coloration	- Ponction ganglionnaire - Ponction de moelle osseuse - Calque cutanés, sérosités dermiques.	- Visualisation des leishmanies (formes amastigotes) ;
- Histologie	- Biopsie ou pièces d'exérèse, intéressant les organes du SPM et la peau.	- Lésions caractéristiques et visualisation des leishmanies (formes amastigotes).
- PCR (Polymérase Chain Réaction) sur mini-tube EDTA ou frottis sur lame.	- Ponction ganglionnaire. - Ponction de moelle osseuse.	- Visualisation de fragments d'ADN ou d'ARN spécifiques de Leishmania sp. Amplifiés après migration.

Chapitre II

« LE GENOME LEISHMANIEN »

II. 1. L'ADN

Depuis que l'ADN a été reconnu comme support de l'information génétique, bien des chercheurs ont rêvé de séquencer l'intégralité des génomes d'être vivants, allant de celui des virus à celui de l'Homme. En effet connaître l'enchaînement complet des bases nucléotides qui constituent un ADN, c'est connaître toute l'information génétique nécessaire l'évolution des être vivant. (BERNOT, 2001).

L'ADN est composé de quatre base : Adénine (A), Guanine (G), Cytosine (C), et Thymine (T), s'associent entre elles de façon complémentaire en formant des couples A-T et G-C par l'intermédiaire de deux liaisons entre A et T et trois liaisons entre C et G (liaisons hydrogènes de faible énergie). (Figure 1.)

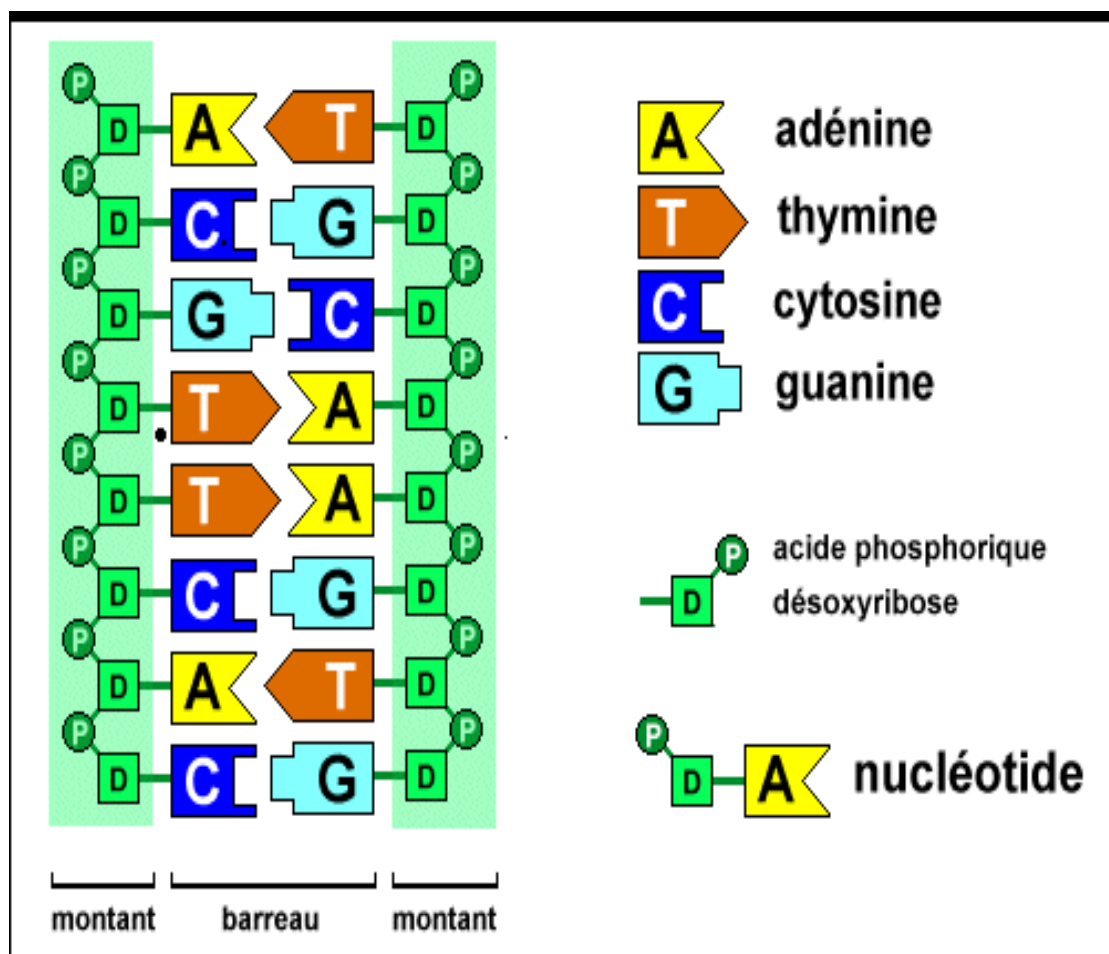


Figure 1 : Aspect général de la molécule ADN (LEWIN, 1998)

II. 2. GENOME KINETOPLASTIQUE

Les génomes Eucaryotes, possèdent certaines caractéristiques dont les génomes procaryotes sont dépourvus. Le règne eucaryote est extrêmement vaste, le genre *Leishmania* en fait partie. (LEWIN, 1998)

Leishmania, comme tous les kinetoplastida, possède deux génomes, l'un nucléaire et l'autre kinetoplastique. En décrivant les caractéristiques de l'ADN de *Leishmania* (génome kinetoplastique), nous tenterons de comprendre son mode de régulation dans l'expression de ses gènes, et donc la différenciation de ce parasite par analyses transcriptomiques et protéomiques.

Le génome kinetoplastique est constitué par deux catégories de molécules d'ADN circulaire qui sont entrelacées et organisées en réseau : les maxicercles, équivalents du génome mitochondrial des mammifères, et les minicercles qui interviennent en modifiant la **transcription des gènes** portés par les maxi-cercles (SIMPSON, 1987).

Le kinetoplaste contient 10 à 30 maxi-cercles identiques, d'une taille de 20 à 40 kb selon les espèces et environ 1000 à 10 000 mini ADN circulaires appelés mini-cercles (Figure.2), avec une taille inférieure à 2 kb. Ces minicercles codent pour des ARN guides impliqués dans l'editing des gènes mitochondriaux des plasmides trypanosomiaux. L'editing est une étape supplémentaire nécessaire de maturation après la transcription pour l'expression des gènes (REAL et al., 1999).

Chaque minicercle présente une région variable d'environ 600 paires de base (pb) et une région constante d'environ 200 pb, conservée parmi les différentes espèces de *Leishmania* à travers le monde (Figure.3). Le nombre important de copies de minicercles au sein de chaque *Leishmania*, donc de ces séquences conservées, en fait des cibles idéales pour les amorces de la PCR qui peut amplifier toutes les classes connues de minicercles des différentes espèces de *Leishmania* (RODGERS et al., 1990).

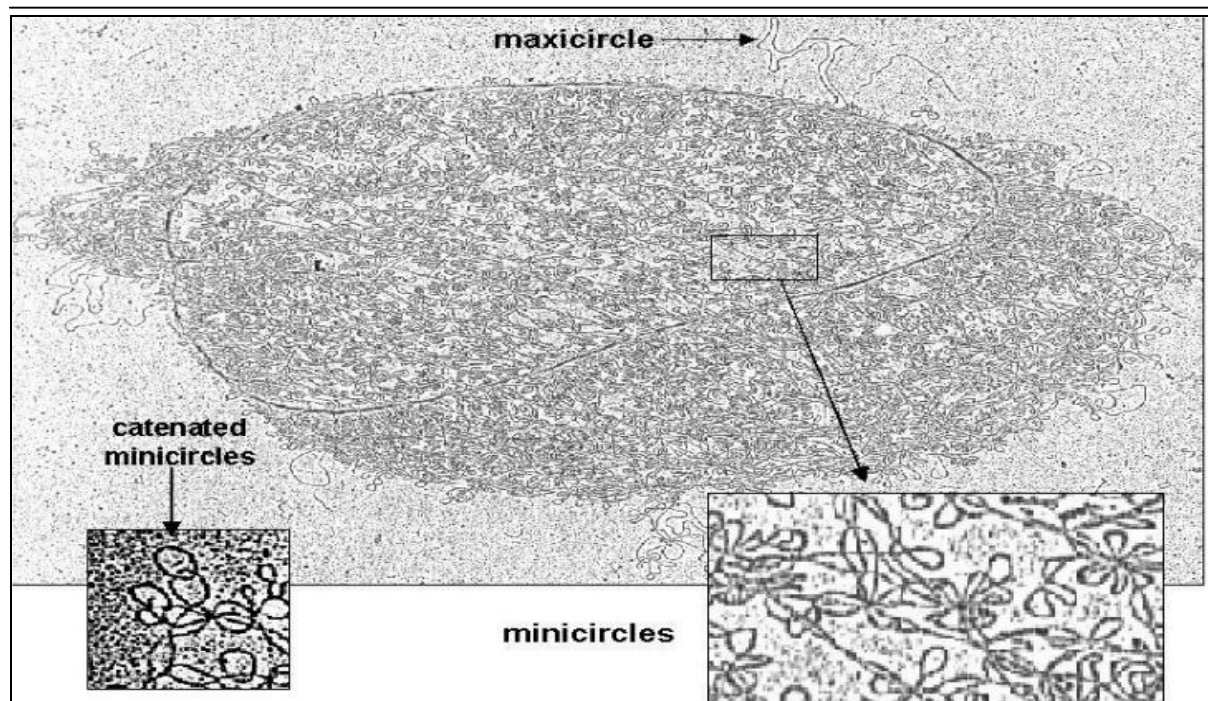


Figure 2. Organisation du kinetoplaste (REAL et al., 1990).

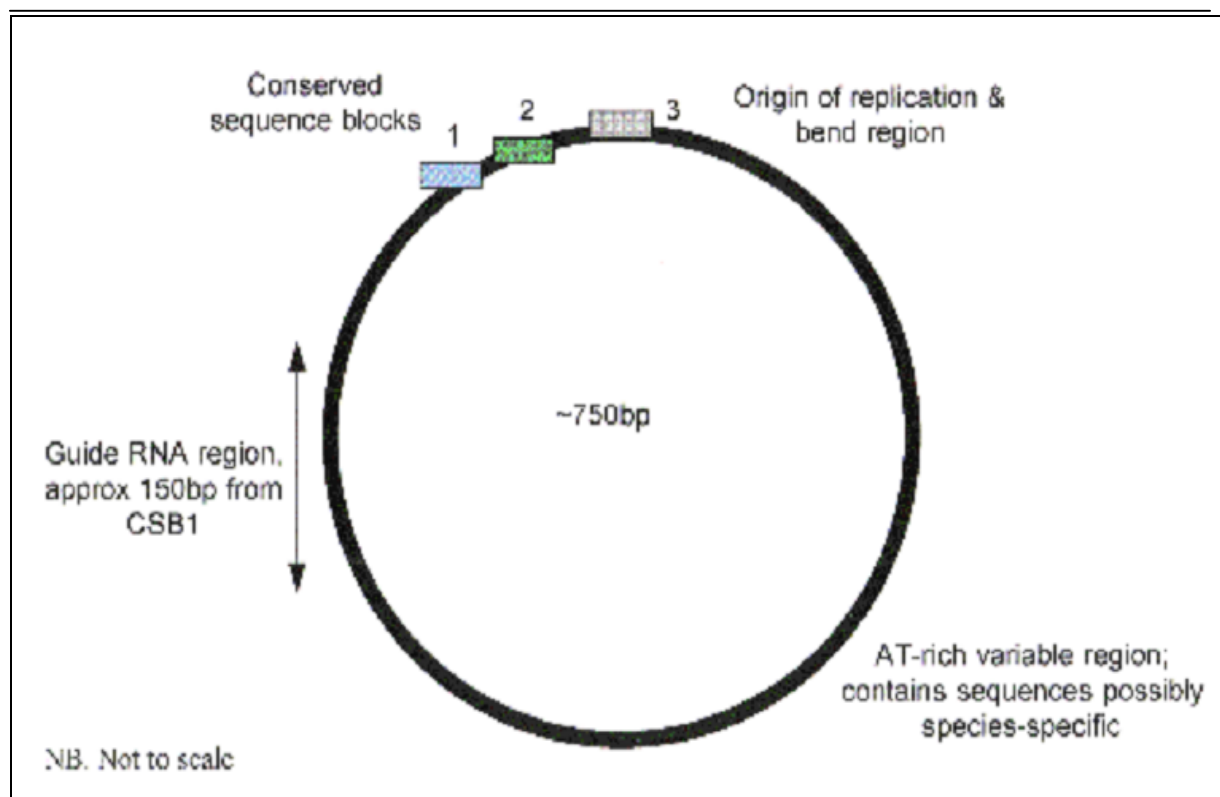


Figure 3. Organisation d'un minicercle (REAL et al., 1990).

II. 3. CARACTERISTIQUES DU GENOME KINETOPLASTIQUE

II. 3. 1. LA TAILLE DU GENOME

Le génome Leishmanien est de petite taille, entre 20 à 40 kb, haploïde, déterminé à partir de l'analyse du caryotype par Electrophorèse sur Champ Pulsé.

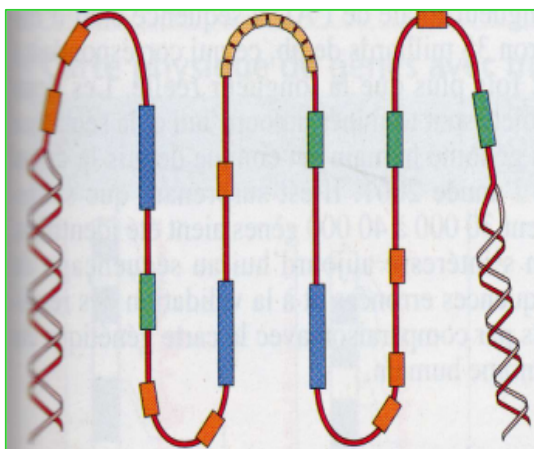
Electrophorèse par champ pulsé sur gel permet la visualisation des chromosomes leishmaniens, et a été employés par le Pr Patrick Bastien et collègues à Montpellier, France pour développer une carte pour caryotype *Leishmania* espèces (Wincker et al. 1996), son principe est de soumettre les molécules d'ADN non pas à un champ électrique uniforme, mais à des champs dont l'orientation change périodiquement.

La taille du génome leishmanien est relativement constante pour toutes les espèces de l'ancien et du nouveau monde.

II. 3. 2. SEQUENCES GENIQUES

L'une des caractéristiques essentielles du génome de *leishmania* est sa richesse en Guanine (G), Cytosine (C), qui s'élèvent à 60% en moyenne. Cet élément est très important quant à l'établissement d'une cartographie de séquences concernant ce parasite.

Il s'agit d'un génome relativement de faible complexité, avec 60-65% de séquences uniques, 13% de séquences moyennement répétées et 12% de séquences fortement répétées (Figure 4.); En dehors des télomères qui sont identiques à ceux de l'homme (CCCTAA). C'est ce qui le rend très polymorphe. Cependant, peu de séquences répétées ont été caractérisées chez *Leishmania* (Wincker et al. 1996),



AND satellite.

SiNE (Short Interspersed Repetitive Elements).

LINE (Long Interspersed Repetitive Elements).

Gène.

Centromère.

Figure 4. ADN satellite (Wincker et al. 1996)

II. 3. 3. NOMBRE DE GENES

Le nombre de gènes connus est encore faible, bien que la plupart des études de biologie moléculaires sur ce parasite se soient intéressées à ce domaine. Cependant le nombre augmente au fur et à mesure que des travaux concernant le séquençage systématique de son ADN se réalisent.

II. 3. 4. PLOÏDIE

Le génome Leishmanien semble être diploïde principalement. La ploïdie chez *Leishmania* n'a pas encore été déterminée avec certitude. Cependant, la diploïdie reste l'hypothèse la plus vraisemblable (Bastien et al, 1992a).

Un petit nombre d'études ont démontré l'existence de deux copies, probablement deux allèles, de plusieurs loci. Si ce parasite est diploïde, il s'agirait néanmoins d'une diploïdie particulière, puisque l'ensemble des marqueurs génétiques utilisés à ce jour (isoenzymes, micro-satellites) montrent une forte homozygotie à la plupart des loci. (Bastien et al, 1992b).

II. 4. ORGANISATION DU GENOME *LEISHMANIA*

Le projet de séquençage de *Leishmania* a pris forme lors d'une réunion à Rio de Janeiro en 1994. De cette réunion est né le *Leishmania Genome Network*, un consortium de laboratoires impliqués dans la cartographie, le séquençage et l'annotation des génomes et dans les tests fonctionnels qui en découlent.

Un projet de séquençage a débuté avec la souche *Leishmania major* 5MHOM/IL/81/Friedlin), son génome d'environ 35 Mb est distribué sur 36 chromosomes dont la taille varie de 0,3 à 2,8 Mb.

Il faut noter que certaines espèces de *L. major* n'ont que 34 ou 35 chromosomes, mais la complexité du génome est globalement conservée. Actuellement, plus de 34 Mb de séquences ont été accumulées dans les banques de données. (Ouellette et al., 2003).

II. 4. 1. CARYOTYPE MOLECULAIRE DE *LEISHMANIA*

La séparation des bandes chromosomiques de *Leishmania* par ordre de taille par électrophorèse en champ pulsé donne un profil complexe appelé **caryotype moléculaire** (Scholler et al, 1986).

Environ 25 à 30 bandes (selon les souches) peuvent être visualisées au total, dont la taille s'étend de 300kb à environ 3Mb (Figure.5). Ces bandes contiennent en fait 36 chromosomes au total. L'utilisation de plusieurs gels avec des conditions de migration différents est nécessaire pour visualiser l'ensemble des classes de taille de chromosomes chez ce parasite, car les bandes sont trop proches et même parfois superposées. (Bastien et al, 1992a).

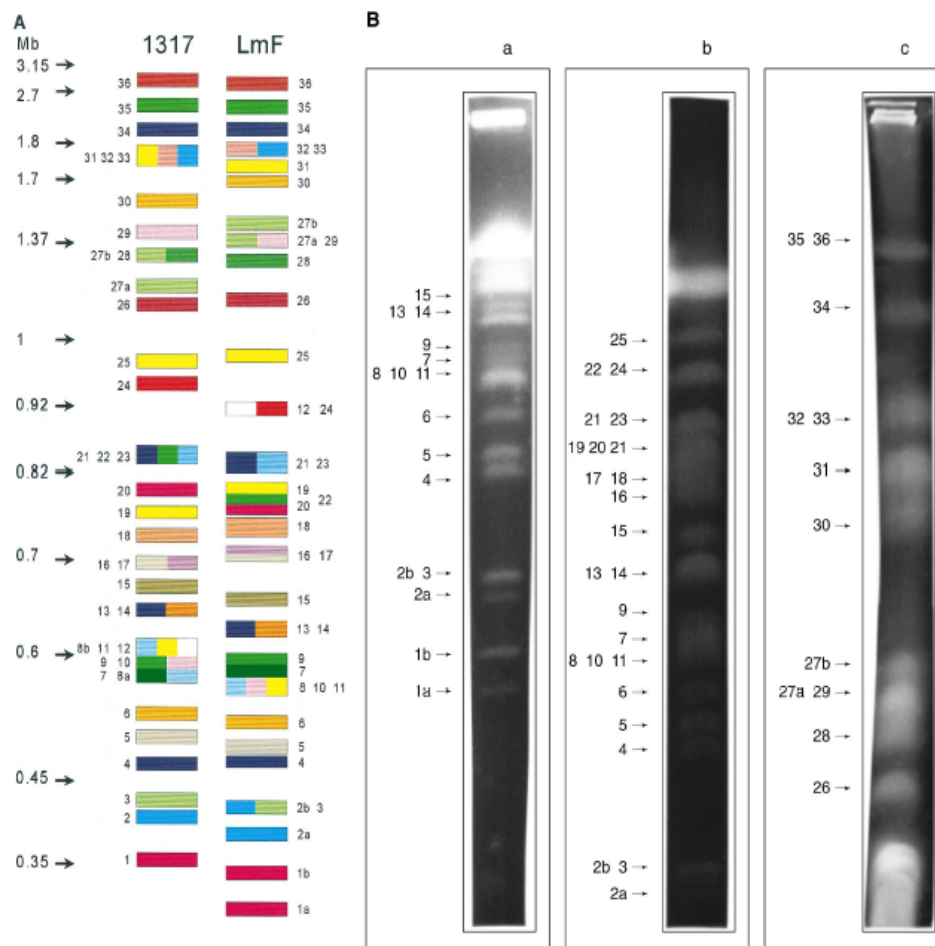


Figure 5. Caryogramme complet de deux souches de *Leishmania* (A),

Le caryotype de la souche Friedlin (B) (Bastien et al, 1992a).

La caractéristique essentielle des caryotypes moléculaires, est le très haut degrés de polymorphisme observé entre souche différentes, même taxonomiquement et géographiquement proches. Ce polymorphisme produit des profils spécifiques de souche, réalisant une véritable « carte d'identité » génétique. (Bastien et al, 1992a).

II. 4. 2. IDENTIFICATION DES CHROMOSOMES

La plupart des projets du génome du parasite *Leishmania* ont employé la stratégie de séquençage complémentaire de l'acide désoxyribonucléique (ADNc) (Figure 4.) substitué aux bibliothèques (Expressed Sequence Tags ou EST) pour l'identification rapide des chromosomes. (Ouellette et al., 2003).

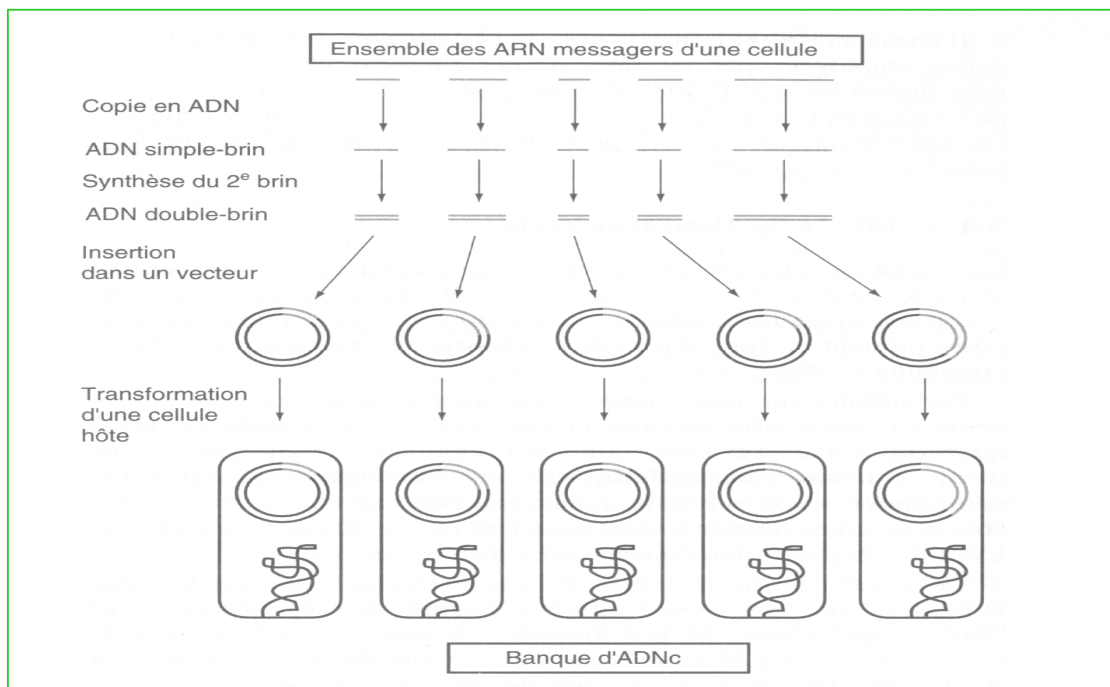


Figure 6. Séquençage complémentaire de l'acide désoxyribonucléique (ADNc)
(Ouellette et al., 2003)

La dénomination de EST définit les séquences partielles d'ADNc obtenues selon une stratégie bien particulière. Un programme de séquençage d'ADNc consiste à caractériser l'ensemble des messagers exprimés par une cellule, après qu'ils ont été clonés sous la forme d'une collection de clones indépendants. (Ouellette et al., 2003).

Après passage des ADN sur gels d'électrophorèse à champ pulsé, et en utilisant des marqueurs de densité différentes, plusieurs chromosomes de *Leishmania* ont pu être identifiés. Ces derniers ont été numérotés par ordre de taille croissante dans la banque internationale au niveau du laboratoire « Génome des Protozoaires Parasites » à Montpellier. (PAGES et al, 1989)

L'identification précise de chaque chromosome a permis de mettre en évidence des variations considérable de la taille des chromosomes entre différentes souches. Ces variations sont témoin du polymorphisme des caryotypes moléculaires chez *Leishmania*.

Les mécanismes régissant ces variations restent jusqu'à présent mal connues, on parle de remaniements intra-chromosomiques au sein d'une même souche, mais aucune n'a pu déterminer les causes exactes de ces remaniements. (RAVEL, 1995)

II. 5. MODE DE REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES

La transcription est la synthèse d'une molécule d'ARN complémentaire à une séquence d'ADN. Les ARN messagers sont destinés à être traduits en protéines dans le cytoplasme. Les ARN de transfert et les ARN ribosomiques sont impliqués dans les phénomènes de traduction.

Chez les eucaryotes en général, l'ARN messager subit une maturation. D'une part, ses extrémités sont modifiées : l'extrémité 5' par l'adjonction d'une coiffe, et l'extrémité 3' par l'adjonction d'une extrémité poly-adenylée. D'autre part, les séquences introniques sont éliminées et les séquences exoniques sont regroupées entre elles : c'est le phénomène d'épissage. (BERNOT, 2001). L'épissage s'effectue grâce à des sites spécifiques situés aux extrémités 3' et 5' de chaque exon.

Leishmania est un parasite qui a divergé tôt dans l'arbre phylogénétique des eucaryotes et son mode de régulation de l'expression des gènes présente de propriétés inédites. En effet, il ne semble pas exister de régulation au niveau de l'initiation de la transcription mais essentiellement une régulation post-transcriptionnelle.

Ainsi, de longs messagers contenant tous les gènes organisés en tandem sont modifiés par addition d'un mini-exon en 5' (par épissage en *trans*), et par polyadénylation en 3' (Figure.5). Tous les messagers de *Leishmania* ont ce mini-exon de 39 nucléotides à leur extrémité 5' et son addition est étroitement associée à la polyadénylation.

Les gènes de *Leishmania* sont organisés en unités polycistroniques. Ces unités sont co-transcrites en très grands pré-messagers qui sont maturés par l'addition d'un mini-exon en 5' (épissage en *trans*) et par polyadénylation en 3'. (Ouellette et al., 2003).

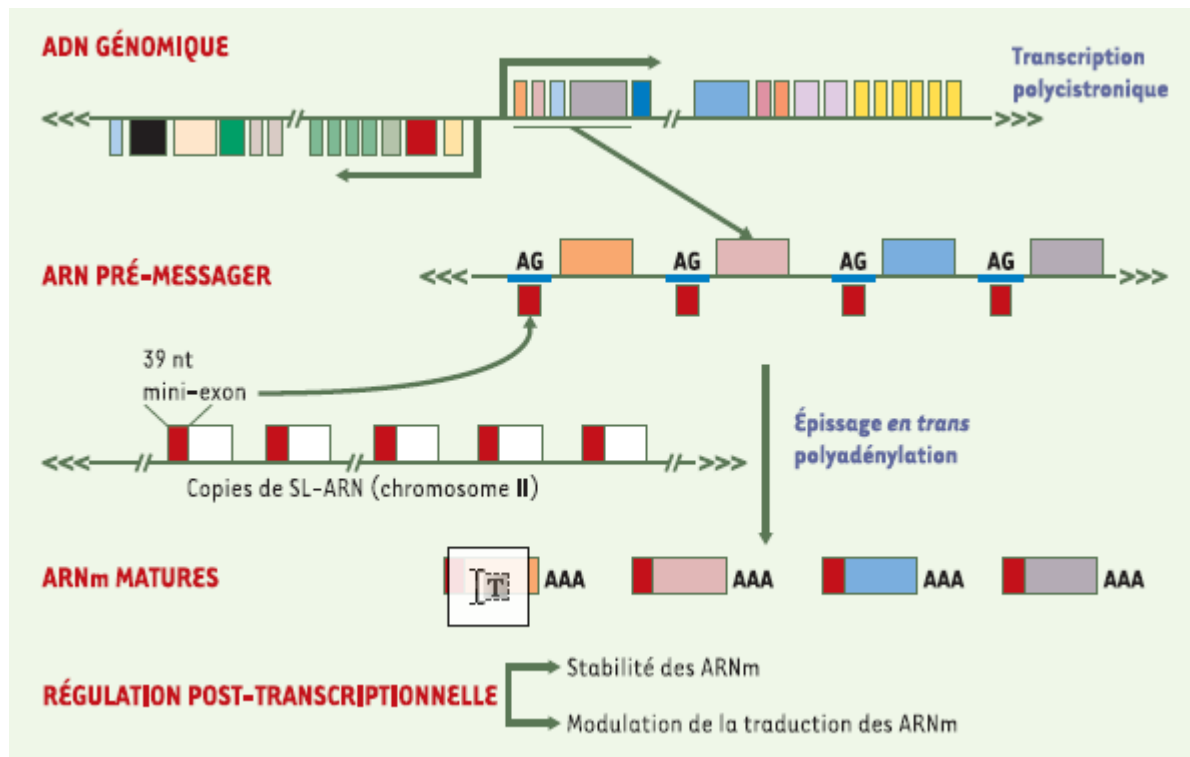


Figure 7. Organisation génique et maturation des messagers chez *Leishmania*.

(Ouellette et al., 2003).

Chapitre III

« DIFFERENTIATION GENOMIQUE DU PARASITE »

III. 1. DIFFERENCIATION DU PARASITE

III. 1. 1. *IN VIVO*

Chez l'insecte vecteur, *Leishmania* se différencie, dans le tractus digestif, de la forme promastigote procyclique flagellée en la forme métacyclique infectieuse, qui migre ultimement dans la trompe de l'insecte et sera ainsi transmise à l'hôte lors d'un repas sanguin. Le parasite pénètre dans les macrophages où il se différencie dans le phagolysosome (vacuole digestive) en la forme amastigote.

III. 1. 2. LA CULTURE *IN VITRO* DU PARASITE

Il est possible de faire croître en laboratoire les divers stades de différenciation de plusieurs espèces de *Leishmania*. Dans différents milieux de culture relativement complexes, pendant la phase de croissance logarithmique à 25°C, le parasite est sous la forme promastigote.

Quand la forme promastigote atteint la phase stationnaire, il y a transformation en forme métacyclique. Traditionnellement, la forme amastigote des parasites était recueillie à partir de culture de macrophages ou d'animaux infectés. Mais depuis quelques années, des conditions de culture en milieu stérile (milieu axénique) ont été réalisées.

Les stimuli qui favorisent la transformation *in vitro* de promastigotes en amastigotes sont le pH acide et la température. En effet, les promastigotes se trouvent naturellement chez le phlébotome dans un milieu neutre et à une température de 25 °C, tandis qu'à l'intérieur du phagolysosome du macrophage de l'hôte, le parasite vit à 37°C et à pH acide.

Cette possibilité de contrôler la multiplication des parasites à différents stades de leur cycle de vie a facilité les études qui visent à identifier des gènes exprimés différenciellement chez le parasite.

III. 2. ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE

III. 2. 1. DEFINITION DU TRANSCRIPTOME

Au même titre que la génomique représente l'étude des génomes sur leur totalité, le transcriptome consiste à établir les profils d'expression des ARN messagers à grande échelle. Cette approche a été initialement mise au point chez les espèces modèles, mais son développement est actuellement en pleine expansion (BERNOT, 2001).

III. 2. 2. ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DU GENOME LEISHMANIEN

Bien qu'il n'y ait pas, chez *Leishmania*, de régulation de l'expression des gènes au niveau transcriptionnel, plusieurs messagers semblent s'accumuler à des stades de développement spécifiques. Les mécanismes impliqués sont peu connus mais pourraient faire intervenir une modulation de la stabilité des ARNm, soit par régulation de la polyadénylation soit par interaction avec des facteurs spécifiques (Ouellette et al., 2003).

Des techniques de criblage différentiel, ont permis d'isoler une vingtaine de gènes exprimés spécifiquement à l'un des stades de différenciation du parasite.

Des analyses récentes de criblage différentiel, réalisées sur des ADNc de promastigotes et d'amastigotes, ont montré que quelques gènes sont différentiellement exprimés entre ces deux stades parmi lesquels des gènes codant pour une famille de protéines membranaires appelée les amastines. (Wu et al, 2000)

D'autres travaux utilisant des technologies apparentées ont également révélé l'expression de gènes spécifiques de ces stades de différenciation. Une technique qui gagne en popularité pour mesurer l'expression différentielle des gènes est celle des puces à ADN. (Ouellette et al., 2003).

III. 2. 3. TECHNIQUE DES PUCES A ADN.

Cette technique permet de déposer sur des lames de verre des milliers de sondes qui peuvent ensuite être hybridées simultanément avec des ADNc marqués par des nucléotides fluorescents provenant, par exemple, de deux stades différents de différenciation.

Bien que le génome de *Leishmania* ne soit pas connu dans son intégralité, des puces ont été réalisées avec des fragments d'ADNc. Les ADNc sélectionnés sont amplifiés par PCR grâce à des oligonucléotides qui leur sont spécifiques, et immobilisés sur une lame à une densité qui peut atteindre 10 000 échantillons par cm². Ils sont hybridés avec des ADNc marqués à la fluorescence, et l'hybridation de chaque ADNc est mesurée et quantifiée. (Figure 6). La détection des signaux d'hybridation permet de déterminer quel gène est exprimé. (Wu et al, 2000)

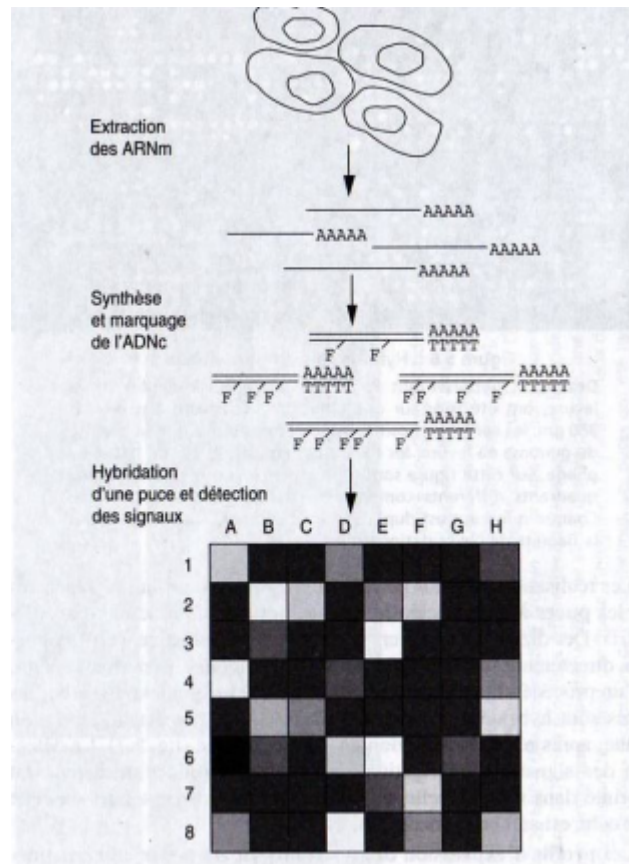


Figure : Utilisation de puces portant des ADNc ou oligonucléotides (BERNOT, 2001).

De la même façon, il est possible de détecter des gènes exprimés spécifiquement à un stade de vie du parasite (promastigote ou amastigote), ou différemment exprimés chez les parasites sensibles ou résistants.

En marquant avec des fluorophores différents des ARN provenant de macrophages naïfs ou infectés par le parasite, ou provenant d'animaux infectés ou non infectés, il sera possible d'observer la réponse de l'hôte de façon globale lorsqu'il interagit avec le

parasite. Les mécanismes impliqués dans ce nouveau mode de régulation de l'expression des gènes sont encore à l'étude. (Wu et al, 2000)

III. 3. ANALYSE PROTEOMIQUE

III. 3. 1. DEFINITION DU PROTEOME

Le terme « protéome » a été proposé en 1995 et couvre la totalité des protéines codées par un génome donné.

Le protéome désigne l'ensemble des protéines exprimées par une cellule ou un tissu à un instant donné.

Par « protéomique », on entend les études concernant l'expression, la fonction et l'interaction des protéines, en relation les une avec les autres, sur la base d'un génome.

La correspondance entre génome, transcriptome, et protéome est loin d'être évidente, puisque plusieurs messagers distincts peuvent être transcrits à partir d'un même gène, et plusieurs protéines peuvent être obtenues à partir d'un même messager. (BERNOT, 2001).

III. 3. 2. METHODE DE RECHERCHE EN PROTEOMIQUE

La méthode de recherche principale en protéomiques est la séparation et l'identification d'un grand nombre de protéines.

Chez les leishmanies, on utilise souvent des extraits de protéines de culture et on obtient ainsi des indications sur différents profils d'expressions.

La méthode la plus importante pour la séparation de mélanges de protéines est l'électrophorèse sur gel bidimensionnel, où l'on sépare les mélanges selon le point isoélectrique dans la première dimension, et selon la masse molaire dans la seconde.

En ce qui concerne le nombre important de protéines exprimées plus faiblement, la méthode de référence pour leur caractérisation repose sur la spectrométrie de masse.

Par électrophorèse bidimensionnelle et en utilisant de nouveaux logiciels, une analyse des protéines solubles exprimées chez *L. infantum* a été réalisée (Figure 7). Les résultats sont

assez convaincants pour l'expression des protéines de la forme amastigote par rapport à la forme promastigote. (El Fakhry et al, 2002)

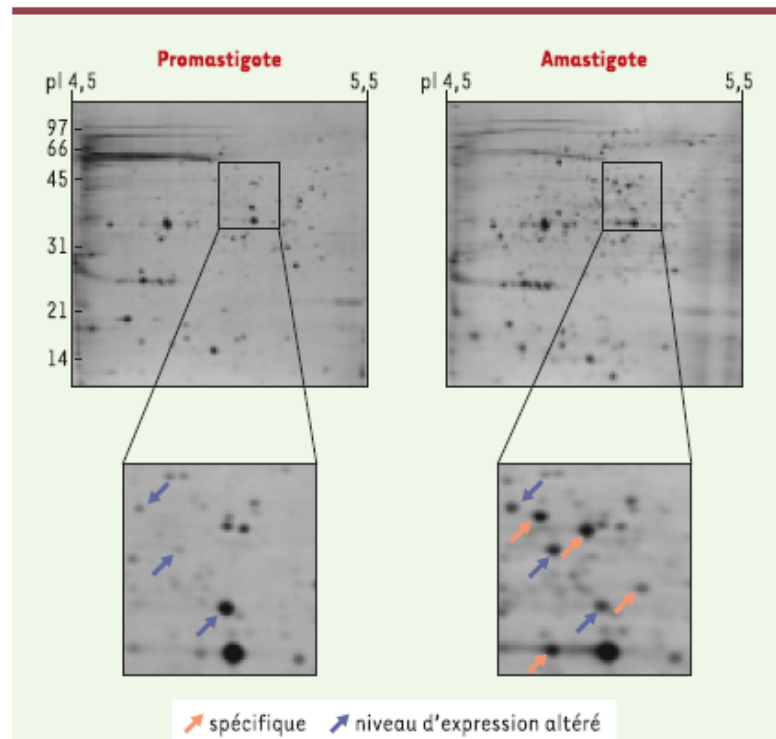


Figure 9 : Expression différentielle des protéines de *Leishmania*
(El Fakhry et al, 2002)

Les gels bidimensionnels présentent, cependant plusieurs limitations, comme la sous représentation des protéines membranaires ou des protéines faiblement exprimées. De nouvelles technologies d'électrophorèse multidimensionnelle seront nécessaires pour une meilleure représentation des protéomes. (Ouellette et al., 2003).

III. 3. 3. AVANTAGES DES ANALYSES PROTEOMIQUES

Les intérêts de l'analyse du protéome par rapport à ceux de l'analyse du génome ou du transcriptome résident dans les caractéristiques suivantes (LEWIN, 1998):

- Un même génome peut donner naissance à beaucoup de protéome différents,

- Le niveau de l'expression des protéines peut être beaucoup plus important que le niveau d'expression des messagers (l'abondance d'une protéine peut être jusqu'à 50 fois différente de celle de son messager).
- Les protéines peuvent fréquemment être modifiées après traduction (par glycosylation, phosphorylation, prénylation, ...): un même gène peut donc donner un nombre important de protéines distinctes.
- Il est très difficile de prédire, à partir de l'analyse des séquences d'ADN ou d'ADNc, dans quelles conditions un gène est transcrit et traduit, à quel stade du développement, dans quel tissu.
- Le nombre de protéines exprimé dans les tissus est de l'ordre de plusieurs milliers

III. 3. 3. LES OBSTACLES RENCONTRES LORS DE L'ANALYSE PROTEOMIQUE

Elle présente cependant un certain nombre de difficultés (LEWIN, 1998):

- Aucun enzyme ne permet l'amplification de protéines (alors que la PCR le permet pour les acides nucléiques).
- Il n'existe pas de milieu d'extraction dans lequel toutes les protéines soient solubles.
- Les protéines faiblement exprimées sont difficilement détectables.
- Le nombre de protéines identifiées peut être énorme, mais leur fonction est souvent inconnue.

III. 3. 4. GENOMIQUE COMPARATIVE

Les différentes espèces de *Leishmania* provoquent différentes pathologies et ce tropisme spécifique est à la fois dû à des propriétés intrinsèques aux différentes souches de *Leishmania* et aux interactions entre des facteurs du parasite et des facteurs de l'hôte.

Une analyse de génomique comparative entre différentes espèces de *Leishmania* devrait permettre d'identifier les gènes caractéristiques de chaque espèce. Actuellement seul le séquençage du génome de *L. major* est en cours. . (Ouellette et al., 2003).

III. 4. CHIMIORESISTANCE

L'étude de la résistance médicamenteuse chez *Leishmania* fait partie de la priorité de l'Organisation Mondiale de la Santé

Les mécanismes de résistance ont été particulièrement bien étudiés *in vitro* et semblent faire intervenir plusieurs gènes.

L'antimoine pentavalent le médicament le plus utilisé pour le traitement de la leishmaniose, est probablement réduit *in vivo* et actif sous la forme trivalente quoique le site de réduction (l'hôte ou le parasite) soit encore indéterminé.

Chez les parasites résistants, l'antimoine pentavalent serait conjugué à une molécule appelée trypanothion, qui est un composé spécifique aux kinétoplastidae. La concentration de ce dernier est effectivement augmentée chez les parasites résistants à l'antimoine.

Il a été montré que chez les parasites résistants à l'antimoine, il existe des mécanismes de résistance additionnels, mais les approches cellulaires et moléculaires traditionnelles se sont avérées infructueuses pour les caractériser.

Grâce à des puces à ADN à faible densité portant une cinquantaine de gènes, de nouveaux gènes différentiellement exprimés chez les mutants résistants mais qui semblent toujours faire partie de la voie métabolique du trypanothion ont été identifiés (Bastien, 1992).

Avec des puces portant le génome complet du parasite, de nouveaux gènes impliqués dans la résistance seront peut-être caractérisés, à condition bien sûr que le mécanisme de résistance fasse intervenir des changements dans le niveau d'expression des gènes. Ces approches permettront de mieux comprendre les mécanismes de résistance, mais aussi d'étudier la réponse aux drogues et de déterminer leurs cibles.

CONCLUSION

Le parasite du genre *Leishmania* est, selon les espèces, responsable de différentes pathologies et représente une cause importante de morbidité et de mortalité en médecine humaine et vétérinaire.

Ce parasite intracellulaire est transmis par l'intermédiaire de la mouche des sables chez un hôte vertébré, où, après différenciation, il se multiplie dans les macrophages.

Le séquençage du génome de l'espèce *Leishmania major* est quasiment terminé. Ces données de séquences s'avèrent une source inestimable pour des études transcriptomiques et protéomiques qui permettent de mieux comprendre le processus de différenciation du parasite, son interaction avec la cellule hôte et sa capacité à résister aux traitements conventionnels.

Une meilleure compréhension de la biologie du parasite et de son interaction avec l'hôte est essentielle pour développer de nouveaux médicaments dont l'action facilitera l'élimination et/ou le contrôle de ce pathogène soit par action directe sur le parasite, soit par modulation de la réponse de l'hôte.

LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **ASHFORD R. W. 2000.** The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Internat. J. Parasitol.* 30: 1269-1281.
- **BASTIEN P, BLAINEAU C, PAGES M; 1992 a.** Molecules karyotype analysis in *Leishmania*. In Intracellular parasite. *Subcellular biochemistry*. 131-187.
- **BASTIEN P, BLAINEAU C, PAGES M; 1992 b.** Leishmania : sex, lies and karyotype. *Parasitol Today*. 8 : 174-177.
- **BERNOT A, 2001.** Analyse de genome transcriptomes et proteomes. *Biotech. Info.* DUNOD. 3eme édition, 4-69-127,
- **DEDET JP, 2001.** Leishmaniasis, Leishmanioses. Biologie, clinique et thérapeutique. *Encycl. Med. Chir. Maladies infectieuses*, 8-506-A-10, 11.
- **DEDET JP, PRATLONG F, LANOTTE G et RAVEL C. 1999.** The parasite. *Clin. Dermatol.* 17: 261-268.
- **DEREURE J, 1993.** Place du chien dans le complexe pathogène leishmaniens des pays du pourtour méditerranéen et du Moyen orient. Thèse pour le Doctorat de parasitologie. Université de Montpellier I. 180 pp.
- **DEREURE J, 1999.** Réservoirs des leishmaniasis. In : les leishmanioses (J. P. DEDET, ed.). *Ed Ellips, Paris*, 109-127.
- **EL FAKHRY Y, OUELLETTE M, PAPADOPOULOU B. A, 2002.** Proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics*; 2: 1007-17.
- **KILLICK-KENDRIK R, KILLICK-KENDRIK M , 1999.** Biology of sandflies vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. In canine leishmaniasis an update (Barcelona 1999). *Hoechst Roussel Vet.* 26-31.
- **KILLICK-KENDRIK, 1979.** Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In: WHR. Lumsden & D. A. Evans Eds. *Biology of kinetoplastida*. Vol 2, Academic Press. London. 396-460.
- **LEWIN B, 1998.** Genes VI. *Cell Press*. 647-887.
- **OUELLETTE M, OLIVIER M, SATO S, PAPADOPOULOU B, 2003.** Le parasite *Leishmania* à l'ère de la post-génomique. *MEDECINE/SCIENCES* ; 19 : 900-9.
- **PAGES M, BASTIEN P, VEAS F, ROSSI V, BELLIS M, WINKER P, RIOUX JA et ROIZES G. 1989.** Chromosome size and number polymorphism in *Leishmania infantum*

suggest amplification/detection and possible genetic exchange. *Mol. Bioch. Parasitol.* 36: 161-168.

- **PRATLONG F, 1985.** Le pouvoir pathogène expérimental, comme critère taxonomique du genre *Leishmania* Ross, 1903. Thèse pour le Doctorat de Parasitologie. Université de Montpellier I. 157pp.
- **RAVEL C, MACARI F, BASTIE P, PAG7S M et BLAINEAU C. 1995.** Conservation among old world *Leishmania* species of six physical linkage groups defined in *Leishmania infantum* small chromosome. . *Mol. Bioch. Parasitol.* 69: 1-8.
- **REAL SL ; MAXIA F ; VITALE NS ; GLORIOSO S ; CARACAPPA & VESCO G. 1999.** Detection of *Leishmania infantum* in dog by PCR with lymph node aspirates and blood. *J. Clin. Microbial.* 37:2931-2935.
- **RIOUX JA, GOLVAN YJ, CROSET H, HOUIN R, JUMINER B, BAIN O, TOUR S. 1967.** Ecologie des leishmanioses dans le Sud de la France. *Ann. Parasitol.* 42 : 561-603.
- **RODGERS MR, POPPER SJ, and WIRTH DF. 1990.** Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasitol.* 71: 267-275.
- **SCHOLLER JK, REED SG, STUART K. 1986.** Molecular karyotype of species and sub-species of *Leishmania*. *Mol. Bioch. Parasitol.* 20: 279-293.
- **SIMPSON, 1987.** The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organisation, transcription, replication and evolution. *Ann. Rev. Microbial.* 41: 363-382.
- **WINCKER P, RAVEL C, BLAINEAU C, PAGES M, JAUFFRET Y, DEDET JP, et BASTIEN P. 1996.** The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved cross widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids. Res.* 24: 1688-1696.
- **WU Y, EL FAKHRY Y, SERENO D, TAMAR S, PAPADOPOULOU B. 2000.** A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol Biochem Parasitol*; 110: 345-57.

GLOSSAIRE

- **Acide nucléique** : terme désignant une substance constituée d'un enchaînement linéaire de nucléotides. Il en existe deux catégories : les acides désoxyribonucléiques (ADN) et les acides ribonucléiques (ARN).
- **ADN** : **A** cide **D** ésoxyribo **N** ucléique, molécule support de l'information génétique héréditaire. L'ADN forme des pelotes microscopiques qui, chez les organismes eucaryotes, sont localisés dans le noyau des cellules. Déroulés, les molécules d'ADN s'étirent en un très long fil, constitué par un enchaînement (séquence) précis d'unités élémentaires que sont les nucléotides. La structure originale de l'ADN, formée de deux brins complémentaires enroulés en hélice (double hélice), lui permet de se dupliquer en deux molécules identiques entre elles et identiques à la molécule mère lors du phénomène de réplication ou duplication. C'est un des constituants des chromosomes. Les gènes sont des segments d'ADN.
- **ADNc** : ADN "complémentaire", copie d'un gène, dépourvue des introns (séquences non codantes) de ce gène
- **Amplification génique** : dite aussi PCR ("polymerase chain reaction"). Technique permettant de recopier de manière exponentielle un fragment d'ADN, gr'ce à l'utilisation d'une enzyme (polymérase).
- **ARN** : **A** cide **R** ibo **N** ucléique, molécule servant à transférer les instructions génétiques inscrites dans l'ADN du noyau vers le cytoplasme (chez les eucaryotes), où ces instructions sont exécutées par la cellule. L'ARN est également formé par un enchaînement précis de nucléotides.
- **ARMm** : acide ribonucléique messenger, forme sous laquelle le message génétique codé dans les gènes est transféré du noyau vers le cytoplasme. Cet ARN est une sorte de "copie" d'un gène, destinée à être utilisée, dans le cytoplasme, comme modèle (par les ribosomes), pour la synthèse d'une protéine.

- **Bases azotées** : molécules entrant dans la composition des acides nucléiques (ADN et ARN), ce sont les éléments porteurs de l'information des nucléotides. L'ADN est constitué des 4 bases suivantes : A = adénine ; G = guanine ; C = cytosine ; T = thymine.
- **Biologie moléculaire** : discipline consacrée à l'étude des molécules porteuses du message héréditaire (ADN, ARN), de leur structure, synthèse, altérations (mutations)...
- **Caryotype** : représentation, formule et ordonnancement (taille) des chromosomes du noyau d'une cellule, obtenus par microscopie ou microphotographie.
- **Chromosomes** : structures différenciées apparaissant dans une cellule en cours de division, sous forme de bâtonnets. Chez les eucaryotes, ils sont situés dans le noyau de la cellule. Constitués d'ADN et de protéines, ils renferment le matériel génétique des cellules. Le génome de la cellule est donc fragmenté entre les différents chromosomes. Ils sont le support de l'hérédité. Ils sont doués du pouvoir d'autoreproduction.
- **Désoxyribose** : sucre, pentose, provenant du ribose et qui a subi la perte d'un atome d'oxygène (désoxygénation). Le désoxyribose entre dans la composition des nucléotides qui constituent l'ADN.
- **Diploïde** : organisme dont les noyaux des cellules somatiques, possèdent deux jeux de chromosomes ($2n$).
- **Electrophorèse** : cette technique permet de séparer des molécules en fonction de leur taille et de leur charge en utilisant un courant électrique. On peut ainsi analyser et purifier dans un milieu gélifié (gel d'agarose, gel de polyacrylamide..) l'ADN, l'ARN, les protéines.

- **Epissage** : mécanisme permettant à un ARN transcrit à partir d'un gène, de se débarrasser des séquences introniques, pour donner de l'ARN messenger (qui sera ensuite traduit en protéine).
- **EST** : "Expressed Sequence Tags". Il s'agit de courtes séquences partielles d'ADNc (350 nucléotides) sélectionnées au hasard à partir de bibliothèques spécifiques de tissus normaux ou pathologiques.
- **Eucaryote** : organisme vivant possédant un noyau isolé du cytoplasme par une membrane et qui contient de l'ADN. Les eucaryotes s'opposent aux procaryotes (bactéries, cyanophycées).
- **Expression** : on dit d'un gène qu'il "s'exprime" quand il est actif, c'est à dire, quand il est transcrit sous forme d'ARN messenger, puis traduit sous forme de protéine.
- **Exon** : fragment de gène dont la séquence d'ADN, après transcription se retrouve dans les ARNm maturés. Cette partie du gène est le plus souvent codante.
- **Gène** : unité d'hérédité contrôlant un caractère particulier. Cet élément génétique correspondant à un segment d'ADN ou d'ARN (virus), situé à un endroit bien précis (locus) sur un chromosome. Chaque région de l'ADN qui produit une molécule d'ARN fonctionnelle est un gène. Le gène est responsable d'une fonction spécifique, correspondant le plus souvent à la synthèse d'une protéine. Chez les eucaryotes les gènes sont portés par les chromosomes mais aussi par l'ADN extranucléaire, cas des mitochondries et des chloroplastes. Chez les procaryotes, les gènes sont localisés dans un chromosome circulaire et éventuellement dans des plasmides.
- **Génome** : ensemble du matériel génétique d'un individu. Patrimoine héréditaire d'un individu.
- **Génomique** : science des génomes. La génomique regroupe un ensemble d'analyses qui vont de l'établissement de cartes du génome (cartographie) à l'identification de nouveaux gènes, à l'étude de leurs fonctions et au séquençage des molécules d'ADN. Dans ces analyses, l'informatique joue un rôle important : des logiciels spécialisés

permettent, par exemple, de classer les gènes en fonction des homologies (ressemblances) de leurs séquences et donc de leurs fonctions.

- **Haploïdie** : chez les eucaryotes, présence d'un jeu unique de chromosomes dans le noyau.
- **Hybridation moléculaire** : technique permettant de mettre en évidence au sein d'une cellule ou d'un tissu, une séquence d'acide nucléique, par exemple de localiser un locus sur un chromosome. Elle est basée sur le principe de complémentarité des bases nucléiques, plus particulièrement entre l'ADN et le brin d'ARN de séquence complémentaire.
- **Intron** : fragment d'un gène situé entre deux exons. Les introns sont présents dans l'ARNm immature et absents dans l'ARNm mature. Fragment "non codant" du gène.
- **Kilobase** : mille bases ou paires de base selon que l'acide nucléique est monocaténaire ou bicaténaire. Le kilobase (kb) est utilisé comme unité de taille.
- **Locus** : emplacement précis d'un gène sur un chromosome.
- **Macrophage** : cellule d'origine sanguine (monocyte) localisée dans les tissus (foie, poumons, ganglions lymphatiques, rate...) qui possède trois fonctions principales : activité de sécrétion (cytokines...) ; coopération cellulaire (c'est une cellule présentatrice d'antigènes, relation avec les lymphocytes) ; phagocytose (ingestion de bactéries, levures, débris cellulaires...).
- **Mutation** : altération du matériel génétique (ADN ou ARN) d'une cellule ou d'un virus qui entraîne une modification durable de certains caractères du fait de la transmission héréditaire de ce matériel génétique de génération en génération.

- **Noyau** : organe propre aux cellules eucaryotes, le noyau contient l'essentiel du génome (chromosomes) et est le siège principal de la synthèse d'ADN et d'ARN. Il est entouré d'une membrane qui le sépare du cytoplasme.
- **Oligonucléotide** : petit segment d'ADN (quelques dizaines de nucléotides) simple brin servant d'amorce et donc complémentaire d'une des extrémités d'un fragment d'ADN à amplifier (PCR).
- **Organites** : éléments différenciés contenus dans les cellules et qui ont des fonctions bien précises. (noyau, chloroplastes, mitochondries...).
- **PCR** : ("polymerase chain reaction") réaction de polymérisation en chaîne. C'est une technique d'amplification enzymatique (Taq polymérase) qui permet à partir d'un fragment d'ADN, d'obtenir un grand nombre (plusieurs millions) de copies identiques de ce même fragment. Cette réaction est réalisée *in vitro* . Elle est très utilisée pour le séquençage des chromosomes du fait qu'elle permet d'avoir une quantité importante d'ADN.
- **pH** : "potentiel d'Hydrogène". Indice permettant de mesurer l'activité de l'ion hydrogène dans une solution. C'est un indicateur de l'acidité (pH inférieur à 7) ou de l'alcalinité (pH supérieur à 7) d'une solution.
- **Phagocytose** : mécanisme qui permet à certaines cellules spécialisées (macrophages, granulocytes neutrophiles) ainsi qu'à certains organismes unicellulaires (protistes) l'ingestion de particules étrangères tels que des bactéries, des débris cellulaires, des poussières... La phagocytose a un rôle important dans la fonction immunitaire, c'est en effet un moyen de défense de l'organisme, notamment lors d'infections bactérienne et parasitaire.

- **Phénotype** : ensemble des caractères observables d'un individu. Le phénotype correspond à la réalisation du génotype (expression des gènes) mais aussi des effets du milieu, de l'environnement.
- **Protéine** : une des plus importantes classes de molécules présentes dans tous les organismes vivants et les virus. Elles assurent l'essentiel des fonctions de la cellule (architecture cellulaire, effecteurs au niveau du fonctionnement). On les retrouve sous différentes formes : enzymes, hormones, récepteurs, neurotransmetteurs... Les protéines sont des macromolécules constituées de longues chaînes d'acides aminés (les éléments de base). La protéine est la résultante du message génétique contenu dans un gène.
- **Récepteur** : protéine, généralement située à la surface des cellules, capable de fixer une molécule informative (médiators chimiques, neurotransmetteurs, hormones...) et de convertir ce message extracellulaire en signal intracellulaire, entraînant une réponse de la part de la cellule.
- **Recombinaison** : échange d'information génétique (brin d'ADN) entre deux secteurs différents du génome. Un exemple fréquent se déroule lors de la méiose entre chromosomes homologues ("crossing over").
- **Régulation** : contrôle de l'expression, ou activité, de ce gène.
- **Réplication** : Mécanisme de production de nouvelles molécules nucléiques (ADN ou ARN) supports de l'information génétique, par copie de la molécule-mère en deux molécules-filles identiques entre-elles et à la molécule-mère. Ce phénomène a lieu au niveau des chromosomes, avant la division cellulaire (réplication chromosomique).
- **Séquençage** : procédé utilisé pour déterminer l'ordre (la séquence) des acides aminés d'une protéine ou des bases dans les acides nucléiques (ADN et ARN).

- **Téломères** : extrémités d'un chromosome intervenant dans sa stabilité et dans les processus cellulaires intervenant dans le vieillissement.
- **Transcription** : processus permettant la copie de l'ADN en ARN. L'ARN synthétiser peut-être de type ARN messenger, de transfert ou ribosomique. C'est la première étape du processus qui permet de passer de l'ADN à la protéine, ou plus concrètement du gène à son produit.
- **Transfection** : introduction d'un ADN étranger dans une cellule cultivée *in vitro*.
- **Vecteur** : Molécule d'ADN capable de s'autorépliquer (plasmide, cosmide, ADN viral) dans laquelle on introduit (*in vitro*) de l'ADN étranger et que l'on utilise ensuite pour faire pénétrer cet ADN dans une cellule hôte.
- **Zoonoses** : maladies animales transmissibles à l'homme.