

PROTEINES DE TUBE POLAIRE DE MICROSPORIDIE, ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR CES PROTEINES ET LEURS APPLICATIONS.

L'invention a pour objet des protéines complètes purifiées de tube polaire (PTPs) de microsporidie ainsi que les gènes codant ces protéines, et leur utilisation dans les domaines du diagnostic.

E. cuniculi est une microsporidie, parasite intracellulaire obligatoire, fréquente chez de nombreux mammifères et impliquée dans diverses infections chez l'homme principalement chez les sujets immunodéprimés. Deux autres espèces du genre *Encephalitozoon* (*E. intestinalis* et *E. hellem*) sont aussi impliquées dans différentes infections opportunistes. De manière générale, les microsporidies sont responsables chez les patients sidéens de pathologies digestives, mais aussi d'atteintes oculaires, musculaires, hépatiques, de rhinosinusites et d'infections systémiques. Des tests sérologiques ont également montré la présence importante des microsporidies chez les patients immunocompétents, puisque atteignant 8% de la population. 4 genres de microsporidie sont responsables de maladies humaines : *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Vittaforma* et *Trachipleistophora*. L'émergence de ces parasites en pathologie humaine suscite de la part des chercheurs un intérêt grandissant dans les domaines systématique, épidémiologique, clinique, du diagnostic et de la thérapeutique.

Ces eucaryotes unicellulaires présentent un mécanisme d'invasion unique. La spore, stade infectieux, renferme en effet un appareil d'extrusion constitué d'un tube polaire inséré à son extrémité antérieure dans un disque d'ancrage. Sous l'effet de certains stimuli, pouvant être liés *in vitro* à une variation du pH, à l'osmolarité, à la présence de cations ou d'anions, le tube polaire est extrudé de la spore microsporidienne et traverse la membrane plasmique d'une cellule-hôte. Le sporoplasme, expulsé à travers ce tube, est ainsi inoculé dans la cellule réceptrice. Cet appareil invasif, spécifique des microsporidies et unique dans le monde vivant, suscite donc un intérêt à la fois d'un point de vue fondamental mais aussi appliqué pour le diagnostic et la thérapeutique.

A ce jour, aucune séquence complète de protéines constituant ce tube polaire n'a été obtenue. Selon Weidner le tube polaire serait constitué d'une seule protéine de 23 kDa chez *Ameson michaelis*. Plus récemment, chez une microsporidie parasite de poisson, *Glugea americanus*, une extraction différentielle des protéines en présence d'un agent réducteur (DTT) a permis de mettre en évidence qu'une protéine de 43 kDa est constitutive du tube polaire, mais seule une partie de la séquence N-terminale de 16 acides aminés a été déterminée.

La production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux a également été réalisée contre le tube polaire de différentes espèces, montrant une possible hétérogénéité protéique de cette structure.

Le protocole expérimental qui y figure comprend des étapes classiques et bien connues de l'homme du métier, telles que l'extraction des protéines sporales, les électrophorèses (SDS-PAGE), la production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux, le microséquençage de peptides ainsi que la détermination d'amorces dégénérées et leur amplification par PCR. Compte-tenu du caractère synthétique du document relatant ce congrès, son enseignement est insuffisant pour permettre à l'homme du métier de reproduire les travaux des Inventeurs et de mettre en évidence la séquence complète d'une protéine complète de tube polaire de microsporidie.

En l'absence de banque génomique, les Inventeurs ont réussi à déterminer les séquences des gènes et leurs régions flanquantes par une technique de SSP-PCR. Ces différentes étapes ont permis de définir la structure complète des gènes, leurs particularités ainsi que les similitudes éventuelles avec d'autres gènes. Les structures primaires des protéines de 55 et 35 kDa ont également été déterminées.