



HAL
open science

Développement d'une technique de siRNA chez l'amibe *Acanthamoeba castellanii*

Amélie Jessu

► **To cite this version:**

Amélie Jessu. Développement d'une technique de siRNA chez l'amibe *Acanthamoeba castellanii*. Microbiologie et Parasitologie. 2020. hal-03359628

HAL Id: hal-03359628

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03359628v1>

Submitted on 30 Sep 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université de Lorraine

Master Microbiologie Environnementale et Sanitaire

**Développement d'une technique de siRNA chez l'amibe
*Acanthamoeba castellanii***

Amélie Jessu

Superviseur : Ascel Régis Samba-Louaka

Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267

Université de Poitiers



Stage effectué du 6 janvier au 19 juin 2020

Remerciements

Je souhaite remercier Mr Jean-Marc Berjeaud, directeur du laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour effectuer mon stage.

Je remercie Marie-Hélène Rodier, chef de l'équipe Microbiologie De l'Eau, de m'avoir intégré à son équipe.

Je tiens à remercier Ascel Régis Samba Louaka, maître de conférences, qui m'a supervisé et guidé pendant durant mon stage. Je remercie également Clément Bernard, post-doctorant, de m'avoir accompagné tout au long de cette expérience.

Je remercierais aussi tous les membres du laboratoire EBI, que j'ai pu solliciter au cours de ce stage.

Préambule

*Ce stage a débuté le 6 janvier 2020. Au vu de la crise sanitaire qui nous a touchés cette année, il a été impacté par l'arrêt complet des expérimentations à compter du 16 mars 2020 jusqu'au 18 mai 2020. A cette date, seule une reprise partielle des activités était possible, me permettant de finaliser une expérience en cours mais pas de finir la totalité des expériences prévues. Cela a été précisé dans le manuscrit quand les résultats ont été impactés. Néanmoins, grâce aux résultats obtenus avant le confinement, **ce manuscrit a été rédigé selon les consignes standard.***

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	7
2. MATERIEL ET METHODES	14
a. Souche utilisée et milieux de culture.....	14
b. Protocole de traitement des cellules avec des siRNA.....	14
c. Extraction d'ARN	15
d. Reverse transcription (RT) et PCR quantitative (qPCR)	15
e. Analyses statistiques	16
3. RESULTATS	17
a. Les siRNA fluorescents semblent pénétrer dans l'amibe <i>A. castellanii</i>	17
b. Adaptation du protocole utilisant des siRNA contre la cellulose synthase.....	20
4. DISCUSSION	28
5. CONCLUSION	31
6. BIBLIOGRAPHIE.....	32
ANNEXE I	38

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Cycle de vie des amibes.	8
Figure 2 : Mécanisme de sous régulation d'un gène par siRNA.	10
Figure 3 : Internalisation des siRNA fluorescents par les trophozoïtes d' <i>A. castellanii</i>	18
Figure 4 : Internalisation des siRNA fluorescents par les kystes d' <i>A. castellanii</i>	19
Figure 5 : Pourcentage d'amibes ayant internalisé les siRNAs fluorescents au cours du temps.....	20
Figure 6 : Expression de la cellulose synthase en fonction de la concentration en siRNA.	22
Figure 7 : Expression de la cellulose synthase en fonction des siRNA utilisés.	24
Figure 8 : Résultats obtenus après l'analyse BLAST des siRNA « scrambled ».	25
Figure 9 : Expression de la cellulose synthase en présence de siRNA anti-cellulose synthase.	26
Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différents types de siRNA, leur biogénèse et leur mode d'action.	12
Tableau 2 : Séquences des siRNA et des amorces de qPCR utilisées durant le stage.	16
Tableau 3 : modifications apportées aux protocoles de Lorenzo-Morales et al. 2005, Dudley et al. 2008 et Aqeel et al. 2013	21

ABREVIATIONS

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

dsRNA : double-stranded RNA

miRNA : microRNA

NCBI : National Center for Biotechnology Information

Nt : nucléotides

PAS : Page's Amoeba Saline

PBS : Phosphate Buffered Saline

piRNA : Piwi-interacting RNA

PTGS : Post-Transcriptional Gene Silencing

PYG : Proteose peptone, Yeast extract, Glucose

rasiRNA : repeat-associated small interfering RNA

RISC : RNA-Induced Silencing Complex

RITS : RNA-induced Transcriptional Silencing

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

shRNA : short hairpin RNA

siRNA : small interfering RNA

scnRNA : small scan RNA

tasiRNA : *trans*-acting siRNA

TGS : Transcriptional Gene Silencing

tncRNA : tiny non codant RNA

1. INTRODUCTION

Les amibes sont des organismes unicellulaires provenant de différents clades eucaryotes parmi les Amoebozoa, les Excavata, les Opisthokonta et les Rhizaria (Simpson et Eglit 2016). Les amibes, du grec « amoibê » qui signifie « transformation », forment donc un groupe polyphylétique au sein des protistes basé sur une caractéristique commune ; leur capacité à changer de forme grâce à des déformations cytoplasmiques appelés les pseudopodes. Ces prolongements sont rétractiles et permettent aux amibes de ramper sur une surface par des mouvements dits amiboïdes et également de se nourrir par phagocytose de bactéries, virus, champignons, d'algues ou d'autres protozoaires.

Les amibes sont retrouvées de façon ubiquitaire dans l'environnement que ce soit dans le sol, les eaux naturelles, les eaux traitées, la poussière, ainsi que dans l'environnement direct de l'Homme comme dans les unités de climatisation, l'eau du robinet domestique, les unités de traitements dentaires, les lentilles de contact (Rodríguez-Zaragoza 1994; Barbeau et Buhler 2001). On en distingue deux types (i) **les amibes libres**, capables de proliférer de façon autonome dans l'environnement. Certaines de ces amibes sont dites amphizoïdes car leur cycle de vie peut se réaliser chez un hôte humain ou animal. C'est le cas, par exemple de *Naegleria fowleri*, retrouvée dans le sol et l'eau. Elle est aussi connue comme « l'amibe mangeuse de cerveaux » car elle peut provoquer la méningo-encéphalite amibienne lorsqu'elle infecte l'Homme (Schuster et Visvesvara 2004). (ii) **les amibes parasitaires** qui ont besoin d'un hôte pour se multiplier. Dans cette catégorie, on retrouve *Entamoeba histolytica* qui est l'agent causal de l'amibiase, une infection du système digestif (Stanley 2003).

Parmi les amibes libres associées à des infections humaines, le genre *Acanthamoeba* est le plus abondant dans l'environnement. Ces amibes peuvent vivre sous deux formes : le trophozoïte et le kyste. La forme trophozoïte, de taille comprise entre 12 et 35 μm , est la forme de nutrition et de prolifération de l'amibe. Cette dernière est métaboliquement active et se multiplie par fission binaire. Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, dans le cas d'une hyperosmolarité, d'une carence en nutriment, de températures extrêmes ou encore de pH extrêmes, le trophozoïte s'enkyste pour donner une forme dormante et résistante appelée kyste (figure 1). Ce dernier a un diamètre d'environ 5 à

20 µm et a une paroi composée de deux couches ; l'ectokyste, la paroi externe et l'endokyste, la paroi interne (Neff et Neff 1969). La paroi est composée principalement de cellulose et confère à l'amibe cette résistance aux agressions extérieures, qu'elles soient physiques ou chimiques (Trabelsi *et al.* 2012; Garajová *et al.* 2019). De nombreux biocides communément utilisés pour le traitement de l'eau ou la désinfection des surfaces par exemple, sont inefficaces sur les kystes (Coulon *et al.* 2010).

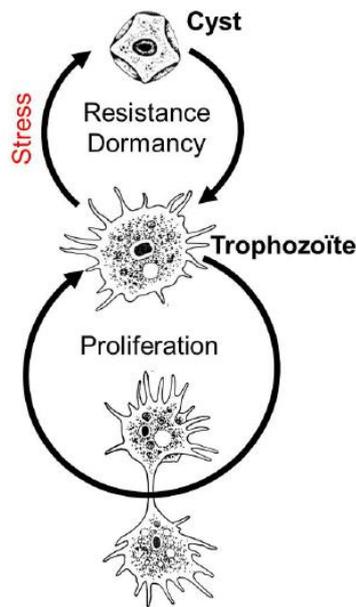


Figure 1 : Cycle de vie des amibes. Lorsque l'amibe est sous forme trophozoïte, sa forme de prolifération, elle se divise. En cas de stress, elle s'enkyste, son métabolisme est en dormance et elle est capable de résister aux conditions défavorables (Schéma : V. Delafont).

Acanthamoeba castellanii est l'espèce la plus connue du genre *Acanthamoeba*. Elle vit dans le milieu extérieur ou peut être retrouvée chez l'Homme, provoquant des infections oculaires (kératites amibiennes) ou du système nerveux central (encéphalite granulomateuse) (Marciano-Cabral et Cabral 2003). Dans l'environnement, *A. castellanii* a un rôle de prédateur car elle phagocyte de nombreux micro-organismes (bactéries, virus, champignons, protozoaires). Toutefois, certains organismes ingérés résistent à la digestion amibienne et peuvent proliférer à l'intérieur de l'amibe. C'est le cas des bactéries pathogènes des genres *Legionella* et *Mycobacterium* (Taylor *et al.* 2003; Whan *et al.* 2006; Magnet *et al.* 2015). A

l'intérieur des amibes, les bactéries sont également protégées des traitements antimicrobiens. Ainsi, les amibes libres sont considérées des réservoirs environnementaux de micro-organismes. On parle également de « chevaux de Troie » du monde microbien car elles favorisent la dissémination d'organismes pathogènes (Thomas et Ashbolt 2011).

A. castellanii s'impose aujourd'hui comme un bon modèle d'étude des fonctions cellulaires eucaryotes. Cet organisme a notamment permis d'importantes avancées dans l'identification et le fonctionnement de nombreuses molécules du cytosquelette telles que l'actine (Isenberg *et al.* 1980; Wong *et al.* 1983), la myosine (Adams *et al.* 1994; Sinard et Pollard 1989) ou encore la profiline (Kaiser *et al.* 1986). **Bien qu'un système de transfection stable d'acides nucléiques ait été mis au point chez cette amibe** (Kong et Pollard 2002; Peng *et al.* 2005), **peu d'outils moléculaires existent pour étudier sa physiologie**. En effet, un seul génome annoté est disponible (Clarke *et al.* 2013) ; dans la littérature, on ne trouve que deux plasmides permettant de sur-exprimer des gènes (pTBPF-eGFP et pGAPDH-eGFP) (Erik Bateman 2010); et les expériences de sous-expression de gènes utilisant l'interférence à l'ARN publiées (Lorenzo-Morales *et al.* 2005; Dudley *et al.* 2008; Aqeel *et al.* 2013) semblent peu reproductibles. **Durant ce stage, nous allons nous intéresser à la technique de l'interférence par l'ARN qui représente un outil de contrôle de l'expression génique.**

L'interférence par l'ARN est un mécanisme naturel chez les eucaryotes qui consiste à réguler négativement l'expression d'un gène grâce à des petits ARN double brin « interférents » (siRNA). Ceux-ci sont obtenus à la suite du clivage du précurseur, un long ARN double brin, par différentes enzymes ; l'enzyme Drosha clive les précurseurs dans le noyau et l'enzyme Dicer clive les précurseurs des siRNA dans le cytoplasme. Ensuite, le brin sens guide le siRNA double brin vers un complexe d'effecteurs, le complexe de chargement, contenant la protéine Argonaute, entre autres, qui est une protéine essentielle à ce mécanisme. Le brin anti-sens est intégré à ce complexe, formant ainsi le complexe RISC (RNA-induced silencing complexe). L'homologie entre le brin anti-sens du siRNA et l'ARNm cible permet l'hybridation de l'ARNm. La protéine Argonaute permet la fixation puis la dégradation de l'ARNm (figure 2) (Tuschl *et al.* 1999; Griffiths-Jones 2004; Valencia-Sanchez *et al.* 2006).

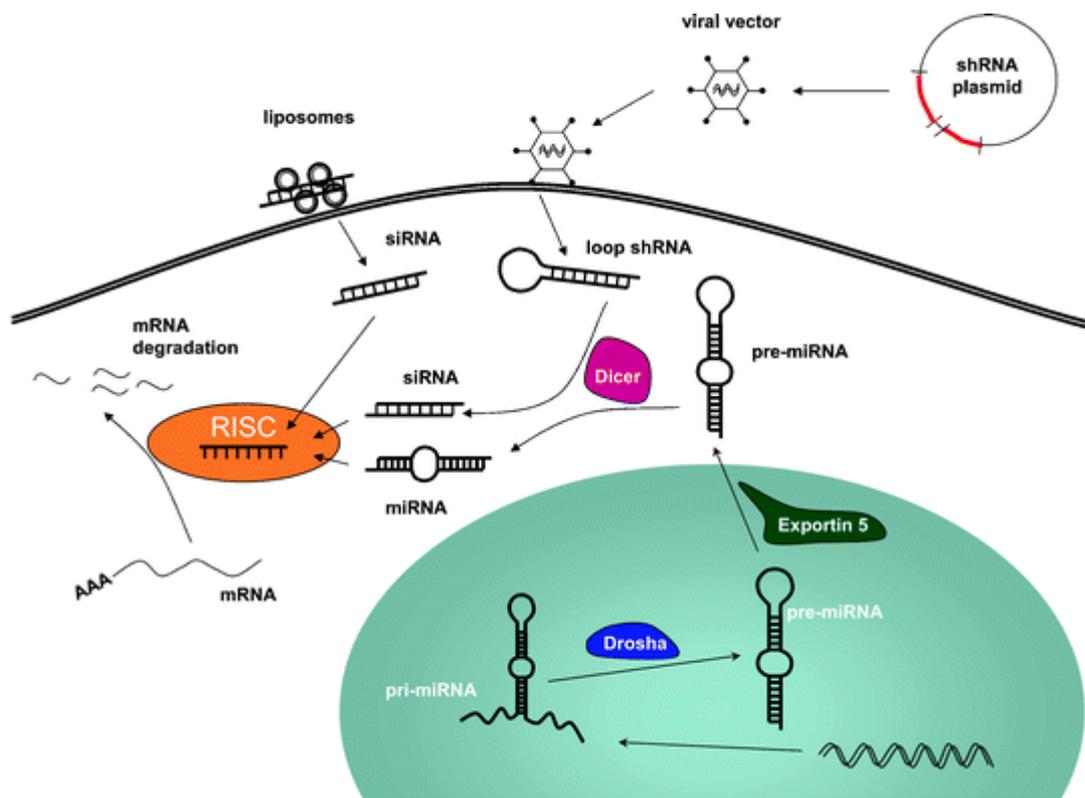


Figure 2 : Mécanismes de sous régulation d'un gène par siRNA. Lorsqu'ils sont internalisés sous forme de siRNA matures, notamment au sein de liposomes, les siRNA sont acheminés vers le cytoplasme et intégrés dans un complexe nommé RISC. Ce complexe entraîne la dégradation de l'ARNm cible. Lorsqu'ils sont internalisés sous forme de précurseurs, notamment lors d'une transfection via un plasmide, ou lorsqu'ils sont produits de façon endogènes, les siRNA sont clivés par différentes enzymes afin d'accéder à leur forme mature ; l'enzyme Drosha agit sur les précurseurs au niveau du noyau, l'exportine 5 permet le passage de la membrane nucléaire afin qu'ils soient clivés par l'enzyme Dicer au niveau du cytoplasme (Lingor 2010).

Depuis la découverte de ce mécanisme en 1998 par Fire *et al.*, l'interférence à l'ARN est utilisée comme un outil génétique permettant l'analyse de la fonction des gènes chez une grande diversité d'organismes. Cet outil est adapté pour cibler le matériel génétique directement dans le noyau ou le cytoplasme (Ullu *et al.* 2004). En effet, lors de la transfection, les siRNA, lorsqu'ils sont utilisés dans leur forme mature, sont acheminés directement dans le cytoplasme (figure 2).

Différents types d'ARN interférents ont été décrits ; selon leur biogénèse (production endogène ou apport exogène) ou selon leur mode d'action pour inhiber l'expression du gène

(au niveau transcriptionnel en remodelant la chromatine, au niveau post-transcriptionnel en dégradant l'ARNm ou au niveau traductionnel en supprimant la traduction).

Les siRNA sont soit (i) produits à partir des ARN en épingle, les « shRNA ». Les shRNA sont introduits directement dans le noyau de la cellule grâce à un vecteur plasmidique. Ils subissent différentes étapes de maturation pour donner les siRNA de 20 à 25 nucléotides environ avec deux nucléotides de surplomb au niveau de l'extrémité 3' (Bernstein *et al.* 2001). Soit (ii) ils peuvent être directement introduit dans le cytoplasme de la cellule sous leur forme siRNA (Elbashir *et al.* 2001) (figure 2). L'inhibition de l'ARNm ciblé se fait au niveau post traductionnel (Tolia et Joshua-Tor 2007).

Les microARN appelés « miRNA », sont des ARN endogènes. Ils subissent également plusieurs étapes de maturation avant d'obtenir des miRNA matures d'environ 20 à 24 nucléotides (Lee *et al.* 2003) (figure 2). Dans ce cas, l'inhibition intervient au niveau de la traduction (Bartel 2004).

D'autres ARN interférents existent dont la biogénèse ou le mécanisme n'est pas toujours bien connu ; les petits ARN de 24 nucléotides agissant en *trans* appelés « tasiRNA » (Peragine *et al.* 2004), les minuscules ARN non codants, d'environ 20 à 21 nucléotides, appelés « tncRNA » (Ambros *et al.* 2003), ou encore les petits scan ARN de 28 nucléotides appelés « scnRNA » (Mochizuki et Gorovsky 2004; Liu *et al.* 2004), les petits ARN interférents répétés-associés, d'environ 24 à 29 nucléotides, appelés « rasiRNA » qui agissent au niveau transcriptionnel en remodelant la chromatine (Stanojcic *et al.* 2011). Mais également des ARN interagissant avec la protéine Piwi, de 26 à 31 nucléotides, appelés « piRNA » et d'autres ARN secondaires (Ruby *et al.* 2006; Sijen *et al.* 2007; Pak et Fire 2007).

Le tableau 1 est un récapitulatif des différents siRNA cités, leur biogénèse ainsi que leur mode d'action.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différents types de siRNA, leur biogénèse et leur mode d'action.

Compartment	Les différents ARN interférents							Enzymes
Noyau	Pri-miRNA (structure en épingle, 500 à 3000 nt)	pre-shRNA (endogène ou exogène)	ND	ND	ND	ND	(Biogénèse non dépendante des enzymes Drosha ou Dicer)	Drosha
	pre-miRNA (70 nt)	long dsRNA (> 200 nt)	ND	ND	ND	ND	ND	Exportine 5 (passage du noyau au cytoplasme)
Cytoplasme	pre-miRNA	long dsRNA	RdRP- derivated long dsRNA	ND	non-coding sequence	ND	ND	Dicer
	miRNA = microRNA (~22 nt)	siRNA (20-26 nt)	tasiRNA (24 nt)	ra-siRNA (24 à 29 nt)	tncRNA (20 à 21 nt)	sncRNA (28 nt)	piRNA (26 à 31 nt)	
	RISC	RISC	RISC	RITS	RISC	ND	ND	complexe effecteurs + protéine Argonaute
Mode d'action	miRNA contient des mésappariements	Parfaite complémentarité entre siRNA et ARNm du gène cible	Agissent en trans	Remodelage de la chromatine	Agissent en trans	Participent à la formation de l'hétérochromatine	ND	
Mode d'inhibition de l'expression	Supprime la traduction et peuvent accélérer la dégradation des ARNm (TR)	Dégradation de l'ARNm (PTGS)	Dégradation de l'ARNm du gène cible	inhibition de la transcription (TGS)	dégradation de l'ARNm du gène cible et peuvent faciliter la suppression de la traduction	Elimination de l'ADN	ND	
Références	Pasquinelli, 2002 Lee et al, 2003 Ullu et al, 2004 Bartel, 2004	Bernstein et al, 2001 Ullu et al, 2004 Peng et al, 2005 Tolia et Joshua-Tor, 2007	Peragine et al, 2004	Stanojcic et al, 2011	Ambros et al, 2003	Mochizuki et Gorovsky, 2004 Liu et al, 2004	Ruby et al, 2006	

Objectifs du stage

L'objectif de ce stage était d'améliorer ou de mettre au point une méthode de régulation de gènes par siRNA chez *A. castellanii*. Ainsi, dans un premier temps, un état de l'art de toutes les méthodes publiées sur la transfection des amibes et la sous-expression des gènes grâce à des ARNs interférents (annexe I) a été réalisé. Dans un second temps, les protocoles existants utilisant des siRNA ont été repris pour les améliorer. La cellulose synthase a été choisie comme gène cible. Cette dernière est induite pendant l'enkystement et permet de synthétiser la cellulose, un constituant essentiel de la paroi des kystes amibiens (Aqeel *et al.* 2013).

2. MATERIEL ET METHODES

a. Souche utilisée et milieux de culture

La souche *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 a été mise en culture dans du milieu PYG (Proteose peptone, Yeast extract, Glucose ; 1 g/L de citrate de sodium, 20 g/L de protéose peptone, 1 g/L d'extrait de levure, 0.4 M de MgSO₄, 0.25 M de Na₂HPO₄, 0.05 M de CaCl₂, 0.25 M de KH₂PO₄, 5 mM de (NH₄)₂FeII(SO₄)₂ et 2 M de glucose, pH 6.5) à 30°C.

Pour induire l'enkystement, *A. castellanii* a été mise en culture dans du tampon d'enkystement (0.1 M de KCl, 8 mM de MgSO₄, 0.4 mM CaCl₂, 20 mM de Tris (2-amino-2hydroxymethyl-1,3-propanediol) et 1 mM de NaHCO₃, pH 8,8) à 30°C.

b. Protocole de traitement des cellules avec des siRNA

Les cellules *A. castellanii* ont été cultivées en milieu PYG jusqu'à avoir une confluence de 70%. Elles ont été détachées, concentrées par centrifugation (5 min à 3000 rpm) et lavées avec du tampon PAS (Page's Amoeba Saline ; 1 g/L de citrate de sodium, 0.4 M de MgSO₄, 0.25 M de Na₂HPO₄, 0.05 M de CaCl₂, 0.25 M de KH₂PO₄, 5 mM de (NH₄)₂FeII(SO₄)₂, pH 6,5). Une suspension cellulaire a été préparée puis déposée dans une microplaque. Des précisions sur chaque protocole sont apportées dans la partie résultat.

Pour la partie optimisation du protocole, l'utilisation de siRNA fluorescents (Block-it fluorescent control ; Invitrogen) a nécessité une microplaque de 24 puits en verre (Vision Plate™ 24 Well TC treated, with Lid) car ce revêtement permet la visualisation sans interférence de la fluorescence de ces siRNA. Les siRNA fluorescents sont utilisés à 100 nM pour les tests d'internalisation, et le volume de transfectant (X-tremeGENE Transfection Reagent ; Roche) est calculé pour respecter le ratio suivant : 1 µg de siRNA pour 2,5 µl de transfectant. Une observation qualitative a été faite au microscope à fluorescence (longueur d'onde d'excitation = 494 nm, longueur d'onde d'émission = 519 nm). Des analyses au cytomètre de flux (CytoFLEX ; Beckman Coulter, USA) ont permis d'avoir une approche quantitative du nombre de cellules fluorescentes (ayant internalisées les siRNA fluorescents).

Lors du traitement siRNA ciblant un ARNm spécifique, les cellules ont été ensemencées dans des microplaques de 6 puits (Thermo Scientific Nunclon™ delta surface). Après 2h d'incubation à 30°C, soit une étape de pré-incubation en milieu PYG a été observée, soit le tampon PAS a été remplacé par du tampon d'enkystement. Les siRNA et le transfectant ont chacun été incubés chacun 2 minutes dans du tampon d'enkystement. Le volume de siRNA est précisé dans la partie résultats ; les concentrations testées vont de 100 à 1000 nM dans un volume final de 2,2 ml. Le volume de transfectant dépend de la quantité de siRNA pour respecter le même ratio de 1 µg de siRNA pour 2,5 µl de transfectant. Les deux solutions sont incubées ensemble pendant 15 minutes à l'obscurité avant d'être déposées dans les puits. La microplaque a été incubée à 30°C pendant 24h. Les séquences des siRNA utilisés sont consignées dans le tableau 2.

c. Extraction d'ARN

Après l'incubation, les kystes et les trophozoïtes ont été lysés séparément avant d'en extraire l'ARN ; les cellules en suspension, correspondant à des kystes matures, ont été récupérées dans des tubes FastPrep contenant des micro-billes de 150-212 µm de diamètre afin d'être lysées mécaniquement avec un homogénéiseur (FastPrep®-24 ; Instrument MP). Les cellules adhérentes, correspondant à des trophozoïtes, ont été directement lysées avec le kit de chez Roche « High Pure RNA Isolation Kit ».

d. Reverse transcription (RT) et PCR quantitative (qPCR)

Le protocole de chez Promega « GoScript™ Reverse Transcription System » a été suivi afin d'obtenir des ADN complémentaires. Les produits de la RT ont été ensuite dilués pour avoir 100 ng d'ADN dans les puits lors de la PCR quantitative. La qPCR a été réalisée avec l'automate de chez Roche « LightCycler 1.5 instrument » en utilisant le kit de chez Roche « LightCycler® FastStart DNA Master^{Plus} SYBR Green I kit ». Chaque puits contenait 10 µl comprenant 5 µl de SYBR Green I Master Mix 2X, 0.5 µl de chaque amorce du gène de la cellulose synthase à 10 µM, 2 µl d'eau et 2 µl d'ADNc ou 2 µl d'eau pour le contrôle négatif. Le gène TBPF (TATA-binding protein Promoter Binding Factor), ayant une expression stable durant l'enkystement et utilisé couramment comme gène de ménage chez *A. castellanii*

(Orfeo et Bateman 1998) a été utilisé comme contrôle. La qPCR a été réalisée selon le programme suivant : une préincubation de 5 min à 95°C, 45 cycles d’amplification (10 sec à 95°C, 10 sec à 60°C, 10 sec à 72°C), 5 sec à 95 °C pour la courbe de fusion et 10 sec à 40°C pour le refroidissement. Le taux d’expression de gène a été calculé avec la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ et normalisé par rapport au gène TBPF. Les séquences des amorces utilisées durant les expériences sont consignées dans le tableau 2.

e. Analyses statistiques

Le dernier protocole de sous-expression de gène a été répété 3 fois. Les résultats ont été analysés par deux tests statistiques ; le test ANOVA et un test de Student, en considérant un seuil de risque de 5% ($p \leq 0,05$).

Tableau 2 : Séquences des siRNA et des amorces de qPCR utilisées durant le stage.

Nom dans le texte	Séquences sens	Séquences anti-sens	Gène cible	Références
siRNA				
siRNA anti-cellulose synthase	5'- GAUCUACGAGAAGAACCG CUU-3'	5'- GCGGUUCUUCUCGUAGA UCUU-3'	cellulose synthase	Aqeel <i>et al.</i> 2013
siRNA 833	5'- GCAAGAAGAGCAAGAACA AUU-3'	5'- UUGUUCUUGCUCUUCUU GCUU-3'	cellulose synthase	Dans cette étude
siRNA <i>scrambled</i>	5'- CAAGCUGACCCUGAAGU UCUU-3'	5'- GAACUUCAGGGUCAGCU UGUU-3'	aucun	Aqeel <i>et al.</i> 2013
Amorces				
Cellulose synthase	5'- TCATCTACATGTTCTGCGC CC-3'	5'- CGATCCAGTTGTTGAGCAT GC-3'	cellulose synthase	Moon <i>et al.</i> 2014
TBPF	5'- GCCGGACAAGAAGCGAAG GAAG-3'	5'- GTCGGTGAAGTAGACGCG GAAG-3'	gène TBPF	Rolland <i>et al.</i> 2020

3. RESULTATS

a. Les siRNA fluorescents semblent pénétrer dans l'amibe *A. castellanii*.

La première étape pour réduire l'expression d'un gène par la technique de l'interférence à l'ARN est l'internalisation des siRNA dans la cellule. Pour visualiser cette étape, des siRNA fluorescents ont été utilisés. Il s'agit d'ARN double brin couplé à une fluorescéine, de même taille, charge et configuration qu'un ARN interférent standard. Ces ARN sont plus stables et permettent donc une observation sur une plus longue période. Pour comparer l'internalisation des siRNA dans les cellules, deux conditions ont été testées : soit les cellules étaient incubées en milieu PYG (figure 3), soit en tampon d'enkystement (figure 4). Le protocole suivi est le suivant : une suspension cellulaire ($2,5 \times 10^4$ cellules/ml) a été préparée soit en milieu PYG soit en tampon d'enkystement, et déposée dans une microplaque 24 puits en verre. Après 1 heure d'incubation des cellules, les siRNA fluorescents ont été ajoutés directement dans les puits à une concentration de 100 nM. Le transfectant a été également ajouté directement dans les puits (ratio : 1 μ g de siRNA pour 2,5 μ l de transfectant). L'observation au microscope a été réalisé au bout de 24 h et 48 h d'incubation.

Un contrôle, pour vérifier que les cellules n'étaient pas fluorescentes, a été réalisé en ne mettant dans le puit que la suspension cellulaire traitées dans les mêmes conditions que les autres puits. Aucune fluorescence n'a été détectée dans ces puits (non présentée).

Lorsque les amibes sont dans le milieu PYG, le signal de la fluorescéine a été observé dès 24 h au sein des amibes (figure 3a et 3b). Les siRNA semblent s'introduire dans l'amibe pendant les 24 h d'incubation. Après 48h d'incubation, moins de cellules semblent présenter le signal GFP (figures 3c et 3d). Pour les cellules encore fluorescentes, le signal apparaît plus diffus dans la cellule.

Lorsque les amibes sont dans le tampon d'enkystement, sur les figures 4a et 4b, la fluorescence observée semble correspondre à des amas de siRNA dans le milieu de culture. Un signal est perçu dans les cellules qu'à partir de 48 h (figure 4c et 4d). D'après nos observations dans différents champs, aucun kyste avec un signal fluorescent n'a été observé. Ce signal n'a été observé que dans des cellules sous forme trophozoïte (figure 4d, flèche

noire). Il est difficile de savoir si l'absence de signal signifie que les siRNA n'entrent pas dans les kystes ou si le signal n'est pas visible à travers la double paroi (exemple d'un kyste sur la figure 4d désigné par la flèche orange).

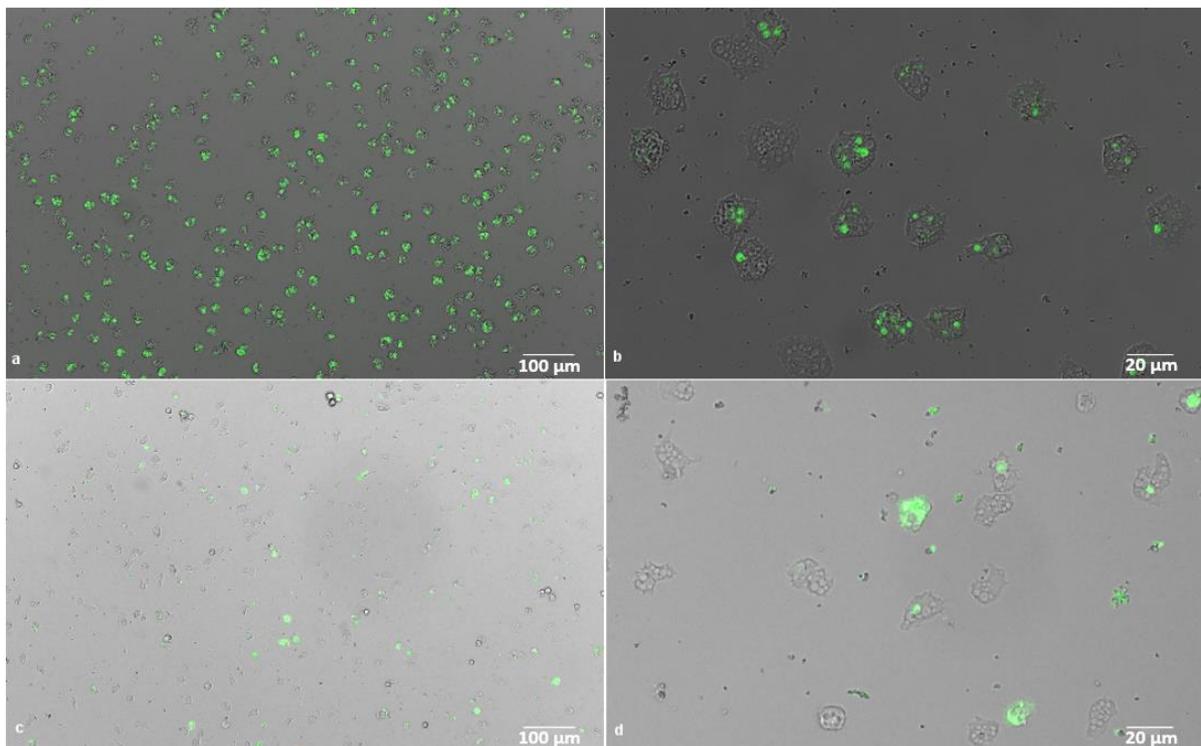


Figure 3 : Internalisation des siRNA fluorescents par les trophozoïtes d'*A. castellanii*. Les amibes ont été incubées en présence de 100 nM de siRNA fluorescents pendant 24 et 48 h en milieu PYG. La couleur verte correspond au signal de la fluorescéine couplée au siRNA). a) après 24 h, grossissement x10 ; b) après 24 h, grossissement x40 ; c) après 48 h, grossissement x10 ; d) après 48 h, grossissement x40.

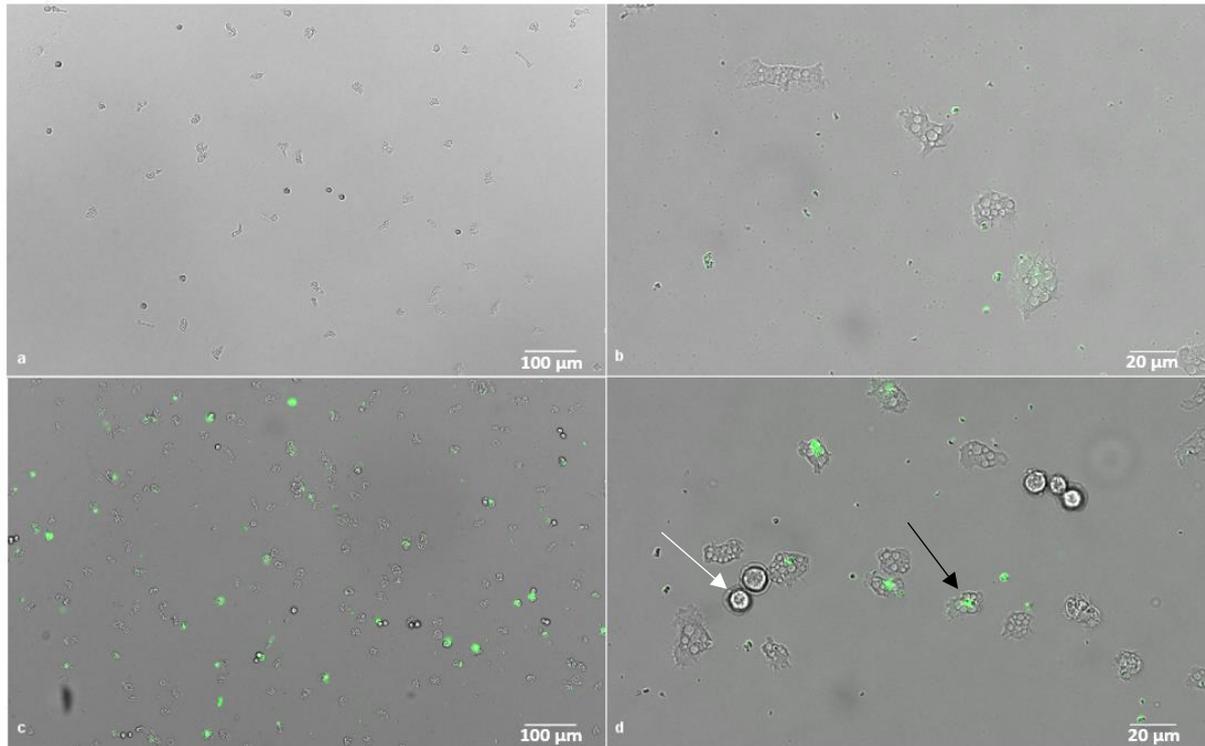


Figure 4 : Internalisation des siRNA fluorescents par les kystes d'*A. castellanii*. *A. castellanii* a été incubée en présence de 100 nM de siRNA fluorescents pendant 24 et 48 h en tampon d'enkystement. La couleur verte correspond au signal GFP (la fluorescéine couplée au siRNA). a) après 24 h, grossissement x10 ; b) après 24 h, grossissement x40 ; c) après 48 h, grossissement x10 ; d) après 48 h, grossissement x40. La flèche noire désigne un trophozoïte. La flèche blanche désigne un kyste.

Afin d'optimiser le temps d'incubation des siRNA avec les amibes, l'expérience a été reconduite dans les conditions suivantes : une première incubation de 2 minutes à température ambiante entre les siRNA et le milieu PYG d'une part et entre le transfectant et le milieu PYG d'autre part, a été réalisée afin d'éliminer les interactions non spécifiques. Les deux solutions ont été ensuite réunies et incubées durant 15 minutes à température ambiante et dans l'obscurité avant d'être déposées dans le puit. Des analyses au cytomètre de flux (figure 5) ont été faites au bout de 1 h, 2 h, 4 h et 21 h d'incubation pour déterminer le temps minimum d'incubation permettant aux siRNA fluorescents d'être internalisés dans la cellule.

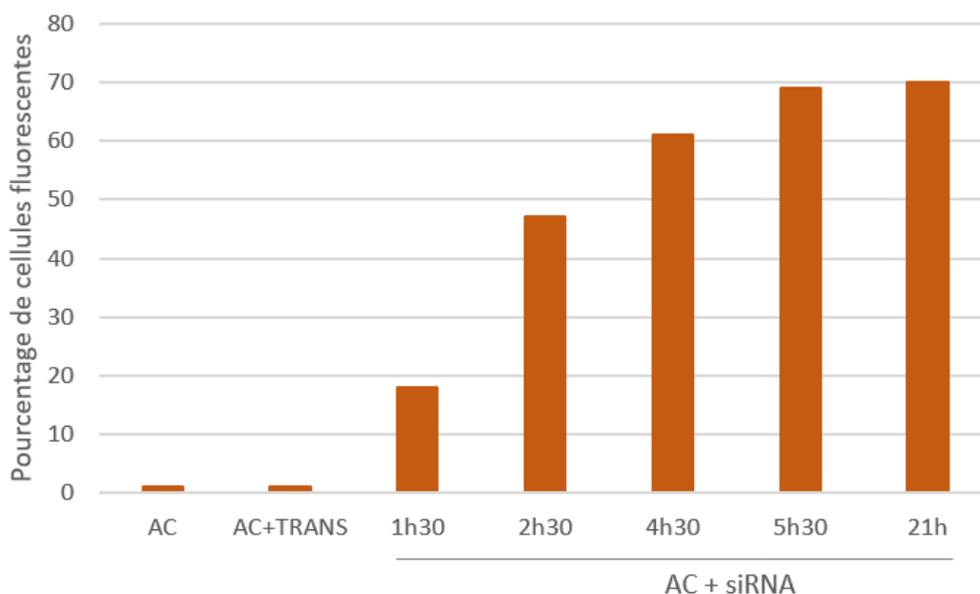


Figure 5 : Pourcentage d'amibes ayant internalisé les siRNAs fluorescents au cours du temps. *A. castellanii* a été incubée en présence de 100 nM de siRNA fluorescents pendant 21 h en milieu PYG. AC : *A. castellanii*, AC+TRANS : *A. castellanii* en présence du réactif de transfection pendant 21 h. (n=1)

La fluorescence de l'amibe *A. castellanii* seule ou en présence du réactif de transfection a été mesurée. Comme attendu, les cellules ne semblent pas fluorescentes. Pour les conditions contenant *A. castellanii* et des siRNA, une augmentation du pourcentage de fluorescence en fonction du temps d'incubation, d'environ 20% après 1 h 30 à presque 70% après 5 h 30, est observée sur ce graphique. Entre 5 h 30 et 24 h, l'augmentation est plus faible. Les siRNA semblent être internalisés dès le début de l'incubation au contact des cellules. Cette conclusion est basée sur une seule expérience (n=1). Celle-ci aurait dû être répétée mais n'a pu l'être en raison des mesures sanitaires.

b. Adaptation du protocole utilisant des siRNA contre la cellulose synthase.

Les protocoles de Lorenzo-Morales *et al.* publié en 2005 et de Dudley *et al.* publié en 2008 ont été adaptés (tableau 3) pour diminuer l'expression du gène de la cellulose synthase. Une suspension à $0,25 \times 10^6$ cellules/ml a été préparée dans du milieu PYG et déposée dans une microplaque 6 puits. Les siRNA dirigés contre la cellulose synthase, publiés par Aqeel *et al.* en 2013, ont été utilisés à différentes concentrations (500 et 1000 nM). Le transfectant et

les siRNA ont été mis en contact pendant 15 minutes avant d'être ajoutés à la culture dans les puits. Pour favoriser l'internalisation et la diffusion des siRNA dans les cellules (cf résultats figures 3 et 4), 18 h d'incubation à 30°C ont été respecté avant d'éliminer le milieu PYG pour le remplacer par du tampon d'enkystement et ainsi induire la formation de kystes. L'incubation dure 24h à 30°C. Nous ciblons la cellulose synthase, qui est exprimée fortement 24h après l'induction de l'enkystement.

Tableau 3 : Modifications apportées aux protocoles de Lorenzo-Morales et al. 2005, Dudley et al. 2008 et Aqeel et al. 2013.

	Protocole Lorenzo-Morales et al. 2005	Protocole Dudley et al. 2008	Protocole Aqeel et al. 2013	Notre protocole
Gène cible	protéase à sérine extracellulaire	protéase à sérine extracellulaire	cellulose synthase	cellulose synthase
Suspension cellulaire	20 x 10 ⁶ cellules/ml	5 x 10 ⁵ cellules/puits	2 x 10 ⁶ cellules	0,25 x 10 ⁶ cellules/ml
Incubation (amibes + siRNA) ?	15 h (milieu non précisé)	1 h en PYG puis 48 h en RPMI (8% glucose)	1 h en PBS puis 72 h en PBS + 10% de glucose	18 h en PYG puis 24 h en tampon d'enkystement
Température d'incubation	30°C	30°C	30 °C	30°C
Concentration des siRNA	15 µg/ml (= 1000 nM)	50, 100 et 200 nM	100 et 200 nM	100, 500 et 1000 nM

Plusieurs conditions ont été testées : le « contrôle positif » correspond à des amibes qui n'ont pas reçu de siRNA. Une condition avec des amibes traitées avec des siRNA ne ciblant aucun gène chez l'amibe *A. castellanii* 30010, *scrambled*, à la concentration la plus haute testée, soit 1000 nM. Et des amibes traitées avec des concentrations croissantes de siRNA anti-cellulose synthase ; 500 et 1000 nM.

Un dénombrement au microscope a été réalisé afin d'établir la proportion de kystes (rapport nombre de kyste/nombre total de cellules) après un traitement au triton 1%. Le triton est un détergent permettant de lyser les trophozoïtes en perméabilisant la cellule.

a)

Echantillons	Pourcentage de kystes (%)
Contrôle sans siRNA	97 +/-
Scrambled avec transfectant	63 +/-
500 nM (siRNA anti-cellulose synthase)	35 +/-
1000 nM (siRNA anti-cellulose synthase)	36 +/-

b)

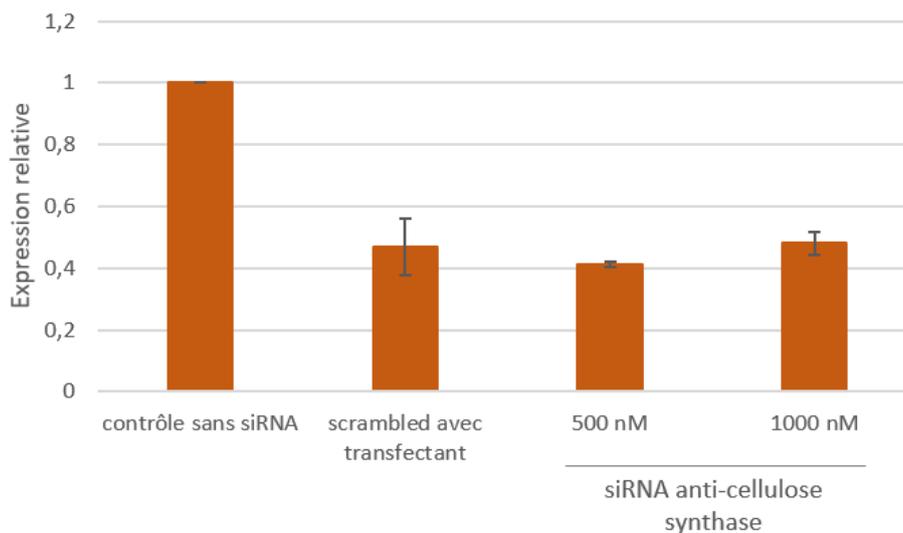


Figure 6 : Expression de la cellulose synthase en fonction de la concentration en siRNA. a) Pourcentage de kystes. Après 18 h d'incubation en PYG + siRNA et 2 4h en tampon d'enkystement, les cellules (trophozoïtes et kystes) sont dénombrées en cellule de comptage Fast-Read. Un traitement au triton 1% est appliqué pendant 10 minutes, puis les kystes sont dénombrées. Le rapport nombre de kystes / nombre total de cellules x 100 a été calculé. b) analyse du niveau de la quantité d'ARNm codant la cellulose synthase. L'extraction de l'ARN a été suivie par une RT-qPCR qui a été réalisée avec les amorces du gène de la cellulose synthase publiées par Moon et al. 2014. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène TBPF. (n=2 expériences indépendantes +/- l'écart-type de la moyenne).

D'après le tableau (figure 6a), et par rapport à la condition *scrambled*, une forte diminution du nombre de kystes est observée pour les deux concentrations avec 35 kystes à 500 nM et 36 kystes à 1000 nM contre 63 kystes pour la condition *scrambled*. Ce résultat

indique un effet sur le phénotype des cellules. Cependant, l'effet des siRNA ne semble pas dépendre des concentrations testées.

Afin de valider ces résultats, nous souhaitons vérifier la diminution du niveau d'ARNm de la cellulose synthase en présence de siRNA anti-cellulose synthase. Une baisse importante des ARNm codant la cellulose synthase est observée dans la condition *scrambled* comparé aux amibes non-traitées. Cette différence peut être accordée aux stress induit par le transfectant. Mais aucune différence n'a été notée pour les cellules traitées avec les différentes concentrations de siRNA (figure 6b). Ces résultats indiquent que les siRNA anti-cellulose ont bien un effet sur le processus d'enkystement car le nombre de kyste a diminué. En revanche, leur efficacité n'a pu se vérifié par le dosage des ARNm de la cellulose synthase par qPCR. On en déduit deux hypothèses : (i) l'efficacité des siRNA ne dure pas dans le temps ; une synthèse d'ARNm en continue empêcherait de visualiser la diminution du taux d'ARNm induite par les siRNA, si le dosage est réalisé dans un délai trop long, (ii) les siRNA ont un effet sur le processus sans viser les ARNm de la cellulose synthase.

Afin d'écartier la possibilité d'un siRNA anti-cellulose synthase non-fonctionnel, des nouvelles séquences de siRNA anti-cellulose synthase ont été mises au point en utilisant le site BLOCK-IT™ RNAI designer et synthétisées (nommées « 833 »). Ainsi, l'efficacité des deux siRNA anti-cellulose synthase a pu être comparé. La même expérience a été reconduite avec les modifications suivantes : les siRNA ont été utilisés à une concentration de 500 nM, en accord avec la littérature. Cette concentration permet également de diminuer le stress induit par le transfectant. Le temps d'incubation des cellules avec les siRNA en milieu PYG a été diminué (6 h). Ce temps permet aux siRNA de pénétrer dans les cellules (résultats figure 5) et diminue le temps de l'expérience, limitant ainsi le risque de dégradation de nos siRNA. Le temps d'incubation de 24h à 30°C en tampon d'enkystement a été conservé.

Deux conditions, avec respectivement les siRNA anti-cellulose synthase et les siRNA 833, ont été réalisées. Une condition avec des amibes traitées avec les deux siRNA a été également testée.

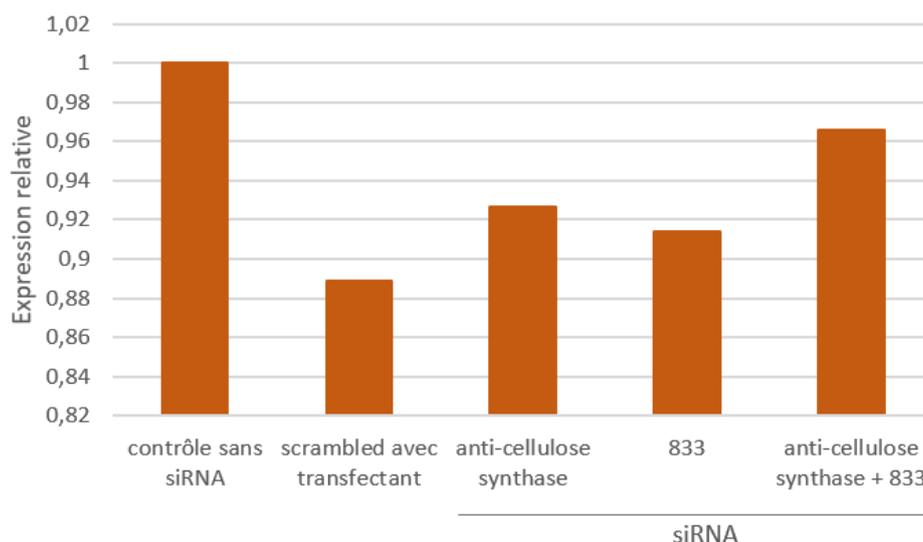


Figure 7 : Expression de la cellulose synthase en fonction des siRNA utilisés. Analyse du niveau de la quantité d'ARNm codant la cellulose synthase. L'extraction de l'ARN a été suivie par une RT-qPCR qui a été réalisée avec les amorces du gène de la cellulose synthase publiées par Moon et al. 2014. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *TBPF* (n=1).

Sur la figure 7, sont représentés les résultats du dosage des ARNm de la cellulose synthase dans les différentes conditions testées. Une nouvelle fois, l'expression de la cellulose synthase dans le contrôle *scrambled* est très basse comparée aux amibes non-traitées. Le niveau de l'ARNm codant la cellulose synthase ne diminue pas en présence des siRNA anti-cellulose synthase. En revanche, en additionnant les deux séquences de siRNA, une augmentation du taux d'ARNm codant la cellulose synthase est observé en comparaison des siRNA uniques. Nous n'avons pas observé un effet clair de nos siRNA anti-cellulose synthase. Pour des raisons économiques et de temps, nous n'avons pas voulu répéter cette expérience négative (pour avoir au moins 3 expériences indépendantes).

Ces résultats nous laissent envisager plusieurs obstacles à lever parmi lesquels : (i) les siRNA *scrambled* ont un effet sur le niveau de la cellulose synthase ; (ii) les siRNA anti-cellulose synthase ne semblent pas efficaces ; (iii) le temps entre la fin du traitement siRNA et l'extraction d'ARN pour étudier la cellulose synthase est trop élevé (24 h), ce qui laisse la possibilité d'une dégradation des siRNA et donc d'une augmentation du niveau d'ARNm. (iv)

les concentrations de siRNA seraient trop élevées et s'accompagneraient d'une cytotoxicité importante.

Concernant les siRNA *scrambled*, ceux-ci ne cibleraient pas directement la cellulose synthase chez *A. castellanii* car la séquence nucléotidique est très éloignée d'après les dix premiers résultats obtenus à la suite d'un alignement de séquences (figure 8).

a)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff BRCA2 repeat-containing protein (ACA1_110350) mRNA, complete cds	30.2	30.2	71%	0.11	100.00%	XM_004357122.1
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff BTB/POZ domain containing protein (ACA1_336400) mRNA, complete cds	28.2	28.2	66%	0.43	100.00%	XM_004341170.1
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff acylCoA dehydrogenase, putative (ACA1_009930) mRNA, complete cds	28.2	48.6	66%	0.43	100.00%	XM_004333036.1
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff adaptor complexes medium subunit family protein (ACA1_071280) mRNA, complete cds	26.3	44.6	80%	1.7	94.12%	XM_004352983.1
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff COMM domain containing protein 6, putative (ACA1_252500) mRNA, complete cds	26.3	26.3	61%	1.7	100.00%	XM_004367504.1
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff homeobox domain containing protein (ACA1_046580) mRNA, complete cds	26.3	26.3	61%	1.7	100.00%	XM_004347720.1
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff leucine rich repeat domain containing protein (ACA1_055030) mRNA, complete cds	26.3	26.3	61%	1.7	100.00%	XM_004344110.1
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff hypothetical protein (ACA1_163110) mRNA, complete cds	26.3	26.3	61%	1.7	100.00%	XM_004340046.1
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff hypothetical protein (ACA1_001980) mRNA, complete cds	26.3	26.3	61%	1.7	100.00%	XM_004338464.1
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff hypothetical protein (ACA1_224580) mRNA, complete cds	26.3	26.3	61%	1.7	100.00%	XM_004338043.1

b)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff BRCA2 repeat-containing protein (ACA1_110350) mRNA, complete cds	30.2	30.2	71%	0.11	100.00%	XM_004357122.1
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff leucine rich repeat domain containing protein (ACA1_055030) mRNA, complete cds	30.2	30.2	71%	0.11	100.00%	XM_004344110.1
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff BTB/POZ domain containing protein (ACA1_336400) mRNA, complete cds	28.2	28.2	66%	0.43	100.00%	XM_004341170.1
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff acylCoA dehydrogenase, putative (ACA1_009930) mRNA, complete cds	28.2	48.6	66%	0.43	100.00%	XM_004333036.1
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff ubiquitin carboxyterminal hydrolase L5, putative (ACA1_358650) mRNA, complete cds	28.2	28.2	66%	0.43	100.00%	XM_004335532.1
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff adaptor complexes medium subunit family protein (ACA1_071280) mRNA, complete cds	26.3	44.6	80%	1.7	94.12%	XM_004352983.1
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff 2,3bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase-like protein (ACA1_050360) mRNA, complete cds	26.3	26.3	61%	1.7	100.00%	XM_004341933.1
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff hydrolase, alpha/beta fold domain containing protein (ACA1_031640) mRNA, complete cds	26.3	46.6	66%	1.7	100.00%	XM_004337931.1
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff homeobox domain containing protein (ACA1_046580) mRNA, complete cds	26.3	26.3	61%	1.7	100.00%	XM_004347720.1
✓	Acanthamoeba castellanii str. Neff hypothetical protein (ACA1_224580) mRNA, complete cds	26.3	26.3	61%	1.7	100.00%	XM_004338043.1

Figure 8 : Résultats obtenus après l'analyse BLAST des siRNA scrambled. a) Résultats pour la séquence sens. b) Résultats pour la séquence anti-sens. (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Concernant la troisième hypothèse (iii), le délai entre la fin du traitement siRNA et l'extraction d'ARN a été supprimé. Pour cela, l'expérience a été répétée avec les modifications suivantes : une suspension cellulaire à $0,4 \times 10^6$ cellules/ml a été préparée dans du tampon PAS (après 3 rinçages afin d'éliminer toutes traces du milieu PYG). L'étape d'incubation des cellules en présence des siRNA en milieu PYG n'a pas été conservée car ce dernier empêcherait

l'induction de la cellulose synthase. Après 2 h d'incubation à 30°C, le tampon PAS a été remplacé par du tampon d'enkystement. Les siRNA et le transfectant ont chacun été incubés séparément dans du tampon d'enkystement pendant 2 minutes. Les siRNA publiés par Aqeel *et al.* en 2013 ont été utilisés à une concentration de 100 nM (concentration également testée dans la littérature et pour diminuer le stress induit par le transfectant), toujours avec un ratio de 1 µg de siRNA pour 2,5 µl de transfectant. La solution de siRNA/tampon d'enkystement et la solution de transfectant/tampon d'enkystement sont incubées ensemble pendant 15 minutes avant d'être déposées dans les puits. La microplaque a été incubée à 30°C pendant 24 h. L'ARN des cellules a été extrait avec le kit « High Pure RNA Isolation » de chez Roche. Une étape de lyse mécanique des kystes matures à l'aide de micro-billes FastPrep a été ajoutée au protocole afin d'optimiser la quantité d'ARN récupéré.

Deux contrôles ont été ajoutés ; un contrôle contenant uniquement la suspension cellulaire avec du transfectant, afin de s'assurer de l'effet du transfectant sur les cellules, et un contrôle contenant la suspension cellulaire et des siRNA *scrambled* (sans transfectant), afin d'observer l'effet de l'ajout d'acides nucléiques sur les cellules.

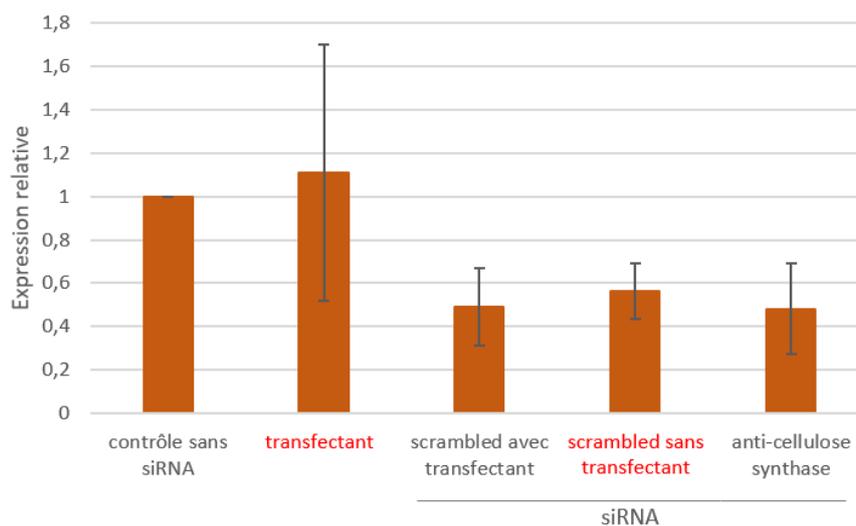


Figure 9 : Expression de la cellulose synthase en présence de siRNA anti-cellulose synthase. Analyse du niveau de la quantité d'ARNm codant la cellulose synthase. L'extraction de l'ARN a été suivie par une RT-qPCR qui a été réalisée avec les amorces du gène de la cellulose synthase publiées par Moon *et al.* 2014. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène *TBPF*. Test statistique (ANOVA) à $p \leq 0,05$ et test de Student à $p \leq 0,05$ avec $n=3$ ($n=2$), les barres d'erreurs représentent l'écart-type.

La figure 9 présente les résultats du dosage des ARNm de la cellulose synthase. D'après les résultats d'un test ANOVA, il y a une différence significative ($p \leq 0,05$) du taux d'expression entre la condition contrôle sans siRNA et les autres conditions. Le niveau d'ARNm codant la cellulose synthase semble être impacté par l'apport de matériel génétique et/ou de transfectant.

L'expression entre la condition contrôle sans siRNA et la condition transfectant ne semble pas différente. Cependant, le taux d'expression de la condition transfectant est une moyenne de seulement 2 réplicats biologiques avec une variabilité importante des résultats. Il n'est pas possible d'appliquer un test statistique et donc difficile de conclure quant à l'effet du transfectant sur les cellules.

La condition scrambled sans transfectant a été comparée à la condition contrôle sans siRNA. La différence d'expression de la cellulose synthase serait différente. Pour la condition scrambled sans transfectant, il s'agit également d'une moyenne basée sur 2 réplicats biologiques. Aucune conclusion ne peut être tirée de ces observations.

Les conditions transfectant et scrambled sans transfectant n'ont été répliquées que 2 fois pour des raisons techniques et n'ont pu être refaites par manque de temps.

D'après le un test de Student, il n'y a aucune différence significative entre la condition « scrambled avec transfectant » et la condition test « siRNA anti-cellulose synthase » ($p \leq 0,05$). Les siRNA anti-cellulose synthase ne semblent donc pas efficaces pour diminuer l'expression de la cellulose synthase dans les conditions testées.

4. DISCUSSION

Pendant ce stage, nous avons tenté de sous-réguler le gène de la cellulose synthase. Chez l'amibe *A. castellanii*, l'enkystement est un processus de plusieurs heures qui conduit le trophozoïte à se différencier en kyste. Plusieurs mécanismes sont impliqués, notamment l'arrêt de la croissance cellulaire, ainsi que des changements de taux d'ARN et d'expression de protéines, un remodelage de la structure avec l'apparition d'une double paroi. Différents gènes ont déjà été reconnus comme fortement impliqués dans l'enkystement tels que la cellulose synthase, la xylose isomérase (Aqeel *et al.* 2013) ou la glycogène phosphorylase (Lorenzo-Morales *et al.* 2008). Ces différentes études ont permis de prouver l'importance de ces gènes, notamment en diminuant leur expression. La cellulose étant le composant principal de la paroi interne formée au cours de ce processus, elle est un candidat idéal afin de mettre au point un protocole pour inhiber l'enkystement. De plus, l'enkystement entraîne un changement morphologique facile à observer et a été étudié dans plusieurs publications (Dudley *et al.* 2008; Aqeel *et al.* 2013; Lorenzo-Morales *et al.* 2010; Martín-Navarro *et al.* 2014).

La méthode de l'interférence à l'ARN, déjà utilisée dans des études précédentes, semblait être un outil adapté car il entraîne une dégradation spécifique en ciblant les ARNm du gène de la cellulose synthase directement. La première étape est l'internalisation des siRNA dans la cellule et la diffusion dans le cytoplasme. Il existe différents moyens tels que la mise en contact de siRNA seul avec les cellules (« *soaking* »), l'apport par phagocytose de bactéries transformées (« *bacterial-feeding* »), l'apport par un vecteur viral ou par un vecteur non viral (par exemple lipidique). Le plus simple à mettre en œuvre est l'apport par un vecteur lipidique (Whitehead *et al.* 2009).

Les résultats des expériences réalisées avec des siRNA fluorescents indiquent que les siRNA ont bien été internalisés dans les cellules avant 24 h d'incubation. Lors de cette expérience, les siRNA et le transfectant ont été ajoutés directement dans la culture d'amibe sans étape préalable d'incubation qui permet la formation de ces complexes lipidiques. La diffusion observée après 48 h d'incubation pourrait indiquer que les siRNA auraient tout de même été délivrés dans le cytoplasme.

Selon plusieurs études, la voie d'absorption des complexes contenant du matériel génétique dépend de différents facteurs comme la composition du complexe, sa taille, sa charge de surface ainsi que du type de cellule visée. Différentes voies peuvent être impliquées pour un même complexe (Lu *et al.* 2009; Gabrielson et Pack 2009; McLendon *et al.* 2010). La macropinocytose résulte de l'extension de la membrane cellulaire. Cette voie fait intervenir l'actine, avec une polymérisation dirigée vers l'extérieur afin de déformer la membrane cellulaire et ainsi envelopper le complexe. Le contenu de la vésicule formée s'écoule dans le cytosol (Conner et Schmid 2003; Khalil *et al.* 2006). D'autres études ont démontré une activité des siRNA sans observer d'endocytose. Ce qui suggère une fusion directe du complexe lipidique contenant les ARN interférents avec la membrane cellulaire permettant de libérer ensuite le contenu dans le cytoplasme de la cellule (Lu *et al.* 2009; McLendon *et al.* 2010).

D'après ces informations et à la vue des premiers résultats, nous supposons que les siRNA ont été internalisés par macropinocytose, puisque deux étapes distinctes ont été observées (l'internalisation et la diffusion). Cette expérience aurait dû être reconduite, en respectant bien l'incubation préalable permettant la formation de complexe entre les siRNA et le transfectant. Ce qui aurait permis, soit de confirmer la voie d'internalisation des siRNA, soit d'observer une diffusion directe dans le cytoplasme, résultant de l'internalisation par fusion avec la membrane de l'amibe.

Une fois internalisés, les siRNA suivent les étapes du mécanisme présenté en figure 2, jusqu'à la dégradation de l'ARNm. Différentes expériences ont été menées dans le but d'améliorer un protocole permettant d'observer, par un dosage par qPCR, la dégradation des ARNm du gène de la cellulose synthase. Bien que les siRNA *scrambled* ne ciblent aucun gène dans le génome d'*A. castellanii* (figure 8), les premiers résultats (figure 6 et 7) indiquent une forte diminution de l'expression de la cellulose synthase lors de l'ajout de matériel génétique ou du transfectant. L'ajout de transfectant lipidique ou de matériel génétique seul (figure 9) pourrait perturber l'expression de la cellulose synthase. Des études comparatives sur les réactifs de transfection ont été publiées ces dernières années. **La cytotoxicité du réactif de transfection est à prendre en compte car elle pourrait affecter l'expression de gènes de manière non spécifique** (Almulathanon *et al.* 2018). Deux cas de figures ont été observés dans la littérature ; (i) plusieurs études mentionnent que la cytotoxicité du réactif seul ne reflète pas la cytotoxicité du réactif complexé avec les siRNA (Nguyen *et al.* 2007; Wang *et al.* 2018)

(ii) en revanche, d'autres études affirment que la complexation du transfectant et des siRNA atténue la cytotoxicité du réactif (Pierrat *et al.* 2015; Wan *et al.* 2016). La cytotoxicité dépend du type de matériel génétique utilisé et de la formulation du réactif de transfection. D'après nos résultats préliminaires, la complexation du transfectant et des siRNA semblerait affecter plus fortement l'expression de la cellulose synthase. Ajoutés seuls avec les cellules, les siRNA ont entraîné une diminution de l'expression de la cellulose synthase, d'après les résultats présentés en figure 9. Dans l'étude publiée par Ocadiz-Ruiz *et al.* (2013), la méthode d'internalisation des siRNA par incubation avec des cellules (sans réactif de transfection) a démontré son efficacité à diminuer l'expression du gène. Sachant que c'est une possible voie d'entrée pour les siRNA, l'expression du gène de la cellulose synthase aurait pu être également affecter de manière non spécifique par la simple présence de matériel génétique étranger.

Différents siRNA anti-cellulose synthase ont été testés et d'après nos premiers résultats, aucune différence n'est observée entre le taux d'expression en présence de siRNA anti-cellulose synthase et le taux d'expression de la condition *scrambled* pour toute nos expériences. Additionnées, les deux séquences de siRNA testées ne semblent pas non plus induire de diminution de l'expression de notre gène (figure 7). Les siRNA de la littérature ont montré une diminution de l'expression de la cellulose synthase de plus 50 % dans des conditions reproduites durant nos expériences (Aqeel *et al.* 2013). Il est admis que ces siRNA ont montré une efficacité précédemment et aurait pu être davantage testés en modulant les conditions.

Il aurait été intéressant de reprendre le protocole décrit pour la figure 9 en utilisant un autre gène cible. Par exemple le gène de la myosine-IC comme cela a déjà été fait (Martín-Navarro *et al.* 2014). C'est une protéine impliquée dans la contraction de la vacuole contractile, permettant de maintenir la balance osmotique chez *A. castellanii*. Ce gène éviterait un changement de milieu. En effet, l'internalisation des siRNA avait été constatée en milieu PYG mais restait incertaine en tampon d'enkystement. Différentes concentrations pourraient être testées sur la même expérience, telles que 100, 200 et 500 nM. Selon les publications, une large gamme de concentration a été testée ; 1000 nM (Lorenzo-Morales *et al.* 2005), 200 et 100 nM (Dudley *et al.* 2008; Aqeel *et al.* 2013) et 50 nM (Dudley *et al.* 2008). Toutes ont entraîné une diminution de l'expression des gènes ciblés.

5. CONCLUSION

Les différentes expériences menées pour sous exprimer le gène de la cellulose synthase chez l'amibe *A. castellanii*, n'ont pas abouti à établir un protocole définitif. Bien que l'internalisation des siRNA dans la cellule ait été constatée, différents points restent critiques tels que la maximisation de l'efficacité des siRNA ou la minimisation de l'effet du réactif de transfection.

Pendant ce stage, le choix de la méthode de transfection s'est porté sur l'utilisation d'un réactif de transfection. Cette méthode a déjà été utilisée chez *A. castellanii* (Dudley *et al.* 2008; Lorenzo-Morales *et al.* 2010; Aqeel *et al.* 2013; Martín-Navarro *et al.* 2014). Cependant, d'autres méthodes existent et seraient envisageables pour peut-être obtenir une meilleure efficacité d'interférence à l'ARN.

La méthode de « *soaking* », avec laquelle les siRNA sont incubés sans vecteur en présence des cellules, serait une alternative au stress induit par le transfectant. En effet, le taux de viabilité ou l'effet cytotoxique ont été vérifiés en parallèle de la régulation de l'expression du gène (Ocadiz-Ruiz *et al.* 2013; Dominguez-Fernandez *et al.* 2018).

La méthode utilisant comme vecteur des bactéries est une technique ayant déjà été mise point sur un autre protozoaire, *Entamoeba histolytica* (Solis *et al.* 2009), et devrait être testée au laboratoire sur *A. castellanii*. Les bactéries sont transformées avec un plasmide contenant la séquence codant un dsRNA (le précurseur des siRNA) et sont phagocytées par l'amibe. Cette technique pourrait limiter également le stress induit par le transfectant en permettant l'internalisation des ARN interférents par phagocytose.

6. BIBLIOGRAPHIE

- Adams, Claire, David N. Dowling, Dan J. O'Sullivan, et Fergal O'Gara. 1994. « Isolation of a Gene (PbsC) Required for Siderophore Biosynthesis in Fluorescent *Pseudomonas* Sp. Strain M114 ». *Molecular and General Genetics MGG* 243 (5): 515-24. <https://doi.org/10.1007/BF00284199>.
- Almulathanon, Ammar A. Y., Elisabetta Ranucci, Paolo Ferruti, Martin C. Garnett, et Cynthia Bosquillon. 2018. « Comparison of Gene Transfection and Cytotoxicity Mechanisms of Linear Poly(Amidoamine) and Branched Poly(Ethyleneimine) Polyplexes ». *Pharmaceutical Research* 35 (4): 86. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2328-7>.
- Ambros, Victor, Rosalind C. Lee, Ann Lavanway, Peter T. Williams, et David Jewell. 2003. « MicroRNAs and Other Tiny Endogenous RNAs in *C. Elegans* ». *Current Biology* 13 (10): 807-18. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00287-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00287-2).
- Aqeel, Yousuf, Ruqaiyyah Siddiqui, et Naveed Ahmed Khan. 2013. « Silencing of xylose isomerase and cellulose synthase by siRNA inhibits encystation in *Acanthamoeba castellanii* | SpringerLink ». 2013. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-012-3254-6>.
- Aslam, Saima, Sudha Bhattacharya, et Alok Bhattacharya. 2012. « The Calmodulin-like Calcium Binding Protein EhCaBP3 of *Entamoeba histolytica* Regulates Phagocytosis and Is Involved in Actin Dynamics ». Édité par L. David Sibley. *PLoS Pathogens* 8 (12): e1003055. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003055>.
- Barbeau, Jean, et Tania Buhler. 2001. « Biofilms Augment the Number of Free-Living Amoebae in Dental Unit Waterlines ». *Research in Microbiology* 152 (8): 753-60. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01256-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01256-6).
- Bartel, David P. 2004. « MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function ». *Cell* 116 (2): 281-97. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5).
- Bateman, Erik. 2010. « Expression plasmids and production of EGFP in stably transfected *Acanthamoeba* ». *Protein expression and purification* 70 (1): 95. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.10.008>.
- Baviskar, SANDHYA N., et MALCOLM S. Shields. 2011. « RNAi Silenced Dd-grp94 (*Dictyostelium discoideum* Glucose-Regulated Protein 94 kDa) Cell Lines in *Dictyostelium* Exhibit Marked Reduction in Growth Rate and Delay in Development ». *Gene Expression* 15 (2): 75-87. <https://doi.org/10.3727/105221611X12973615737587>.
- Bekliz, Meriem, Said Azza, Hervé Seligmann, Philippe Decloquement, Didier Raoult, et Bernard La Scola. 2018. « Experimental Analysis of Mimivirus Translation Initiation Factor 4a Reveals Its Importance in Viral Protein Translation during Infection of *Acanthamoeba polyphaga* | Journal of Virology ». 2018. <https://jvi.asm.org/content/92/10/e00337-18.short>.
- Bernstein, Emily, Amy A. Caudy, Scott M. Hammond, et Gregory J. Hannon. 2001. « Role for a Bidentate Ribonuclease in the Initiation Step of RNA Interference ». *Nature* 409 (6818): 363-66. <https://doi.org/10.1038/35053110>.
- Clarke, Michael, Amanda J. Lohan, Bernard Liu, Ilias Lagkourdos, Scott Roy, Nikhat Zafar, Claire Bertelli, et al. 2013. « Genome of *Acanthamoeba castellanii* Highlights Extensive Lateral Gene Transfer and Early Evolution of Tyrosine Kinase Signaling ». *Genome Biology* 14 (2): R11. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-2-r11>.
- Conner, Sean D., et Sandra L. Schmid. 2003. « Regulated Portals of Entry into the Cell ». *Nature* 422 (6927): 37-44. <https://doi.org/10.1038/nature01451>.
- Coulon, Céline, Collignon, McDonnell, et Thomas. 2010. « Resistance of *Acanthamoeba* Cysts to Disinfection Treatments Used in Health Care Settings | Journal of Clinical Microbiology ». 2010. <https://jcm.asm.org/content/48/8/2689.short>.
- Dominguez-Fernandez, Tania, Mario Rodriguez, Virginia Sanchez Monroy, Consuelo Gomez Garcia, Olivia Medel, et David Guillermo Perez Ishiwara. 2018. « Frontiers | A Calpain-Like Protein Is Involved in the Execution Phase of Programmed Cell Death of *Entamoeba histolytica* | Cellular

- and Infection Microbiology ». 2018. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00339/full>.
- Dudley, Ricky, Selwa Alsam, et Naveed Ahmed Khan. 2008. « role of proteases in the differentiation of *Acanthamoeba castellanii* | FEMS Microbiology Letters | Oxford Academic ». 2008. <https://academic.oup.com/femsle/article/286/1/9/593034>.
- Elbashir, Sayda M., Winfried Lendeckel, et Thomas Tuschl. 2001. « RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs ». *Genes & Development* 15 (2): 188-200.
- Fire, Andrew, SiQun Xu, Mary Montgomery, Steven Kostas, Samuel Driver, et Craig Mello. 1998. « Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* | Nature ». 1998. <https://www.nature.com/articles/35888>.
- Gabrielson, Nathan P., et Daniel W. Pack. 2009. « Efficient Polyethylenimine-Mediated Gene Delivery Proceeds via a Caveolar Pathway in HeLa Cells ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 136 (1): 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.02.003>.
- Garajová, Mária, Martin Mrva, Naděžda Vaškovicová, Michal Martinka, Janka Melicherová, et Andrea Valigurová. 2019. « Cellulose Fibrils Formation and Organisation of Cytoskeleton during Encystment Are Essential for *Acanthamoeba* Cyst Wall Architecture ». *Scientific Reports* 9 (1): 4466. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41084-6>.
- Griffiths-Jones, Sam. 2004. « The MicroRNA Registry ». *Nucleic Acids Research* 32 (suppl_1): D109-11. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh023>.
- Isenberg, Gerhard, Ueli Aebi, et Thomas D. Pollard. 1980. « An Actin-Binding Protein from *Acanthamoeba* Regulates Actin Filament Polymerization and Interactions ». *Nature* 288 (5790): 455-59. <https://doi.org/10.1038/288455a0>.
- Jung, Suk-Yul, Jong-Hyun Kim, Yang-Jin Lee, Kyoung-Ju Song, Kyongmin Kim, Sun Park, Kyung-il Im, et Ho-Joon Shin. 2008. « *Naegleria fowleri*: Nfa1 Gene Knock-down by Double-Stranded RNAs ». *Experimental Parasitology* 118 (2): 208-13. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.08.008>.
- Kaiser, D. A., M. Sato, R. F. Ebert, et T. D. Pollard. 1986. « Purification and Characterization of Two Isoforms of *Acanthamoeba* Profilin. » *Journal of Cell Biology* 102 (1): 221-26. <https://doi.org/10.1083/jcb.102.1.221>.
- Khalil, Ikramy A., Kentaro Kogure, Hidetaka Akita, et Hideyoshi Harashima. 2006. « Uptake Pathways and Subsequent Intracellular Trafficking in Nonviral Gene Delivery ». *Pharmacological Reviews* 58 (1): 32-45. <https://doi.org/10.1124/pr.58.1.8>.
- Kong, Hyun-Hee, et Thomas D. Pollard. 2002. « Intracellular Localization and Dynamics of Myosin-II and Myosin-IC in Live *Acanthamoeba* by Transient Transfection of EGFP Fusion Proteins ». *Journal of Cell Science* 115 (24): 4993-5002. <https://doi.org/10.1242/jcs.00159>.
- Lee, Yoontae, Chiyong Ahn, Jinju Han, Hyounjeong Choi, Kaekwang Kim, Jeongbin Yim, Junho Lee, et al. 2003. « The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing | Nature ». 2003. <https://www.nature.com/articles/nature01957>.
- Lima, Paula, Natasha Botwright, James Harris, et Mathew Cook. 2015. « Validation of a feeding strategy to deliver bacterially expressed dsRNA to marine amoeba from the genus *Neoparamoeba* - Lima - 2017 - Aquaculture Research - Wiley Online Library ». 2015. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/are.12929>.
- Linford, Alicia S., Heriberto Moreno, Katelyn R. Good, Hanbang Zhang, Upinder Singh, et William A. Petri. 2009. « Short Hairpin RNA-Mediated Knockdown of Protein Expression in *Entamoeba histolytica* ». *BMC Microbiology* 9 (1): 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-38>.
- Lingor, Paul. 2010. « Regulation of Cell Death and Survival by RNA Interference – The Roles of miRNA and siRNA ». In *Apoptosome: An up-and-Coming Therapeutic Tool*, édité par Francesco Cecconi et Marcello D'Amelio, 95-117. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3415-1_5.
- Liu, Yifan, Kazufumi Mochizuki, et Martin Gorovsky. 2004. « Histone H3 lysine 9 methylation is required for DNA elimination in developing macronuclei in *Tetrahymena* | PNAS ». 2004. <https://www.pnas.org/content/101/6/1679.short>.

- Lopez-Rosas, Itzel, Esther Orozco, Laurence Marchat, Guillermina Garcia-Rivera, Nancy Guillen, Christian Weber, Eduardo Carrillo-Tapia, Olga Hernandez de la Cruz, Carlos Perez-Plasencia, et Cesar Lopez-Camarillo. 2012. « mRNA Decay Proteins Are Targeted to poly(A)+ RNA and dsRNA-Containing Cytoplasmic Foci That Resemble P-Bodies in *Entamoeba histolytica* ». 2012. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3454373/>.
- Lorenzo-Morales, Jacob, Jarmila Kliescikova, Enrique Martinez-Carretero, Luis Miguel De Pablos, Bronislava Profotova, Eva Nohynkova, Antonio Osuna, et Basilio Valladares. 2008. « Glycogen Phosphorylase in *Acanthamoeba* Spp.: Determining the Role of the Enzyme during the Encystment Process Using RNA Interference ». *Eukaryotic Cell* 7 (3): 509-17. <https://doi.org/10.1128/EC.00316-07>.
- Lorenzo-Morales, Jacob, Carmen Martin-Navarro, Atteneri Lopez-Arencibia, Maria Santana-Morales, Raquel Afonso-Lehmann, Sutherland Maciver, Basilio Valladares, et Enrique Martinez-Carretero. 2010. « Therapeutic Potential of a Combination of Two Gene-Specific Small Interfering RNAs against Clinical Strains of *Acanthamoeba* | Antimicrobial Agents and Chemotherapy ». 2010. <https://aac.asm.org/content/54/12/5151.short>.
- Lorenzo-Morales, Jacob, Antonio Ortega-Rivas, Pilar Foronda, Néstor Abreu-Acosta, David Ballart, Enrique Martínez, et Basilio Valladares. 2005. « RNA Interference (RNAi) for the Silencing of Extracellular Serine Proteases Genes in *Acanthamoeba*: Molecular Analysis and Effect on Pathogenicity ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 144 (1): 10-15. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.07.001>.
- Lu, James J., Robert Langer, et Jianzhu Chen. 2009. « A Novel Mechanism Is Involved in Cationic Lipid-Mediated Functional siRNA Delivery ». *Molecular Pharmaceutics* 6 (3): 763-71. <https://doi.org/10.1021/mp900023v>.
- Magnet, A., R. H. S. Peralta, T. S. Gomes, F. Izquierdo, C. Fernandez-Vadillo, A. L. Galvan, M. J. Pozuelo, C. Pelaz, S. Fenoy, et C. Del Águila. 2015. « Vectorial Role of *Acanthamoeba* in *Legionella* Propagation in Water for Human Use ». *Science of The Total Environment* 505 (février): 889-95. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.064>.
- Marcial-Quino, Jaime, Saúl Gómez-Manzo, Francisco Fierro, Yadira Rufino-González, Daniel Ortega-Cuellar, Edgar Sierra-Palacios, America Vanoye-Carlo, et al. 2017. « RNAi-Mediated Specific Gene Silencing as a Tool for the Discovery of New Drug Targets in *Giardia Lamblia*; Evaluation Using the NADH Oxidase Gene ». *Genes* 8 (11): 303. <https://doi.org/10.3390/genes8110303>.
- Marciano-Cabral, Francine, et Guy Cabral. 2003. « *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans | Clinical Microbiology Reviews ». 2003. <https://cmr.asm.org/content/16/2/273.short>.
- Martín-Navarro, Carmen M., Jacob Lorenzo-Morales, Atteneri López-Arencibia, María Reyes-Batlle, José E. Piñero, Basilio Valladares, et Sutherland K. Maciver. 2014. « Evaluation of *Acanthamoeba* Myosin-IC as a Potential Therapeutic Target ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (4): 2150-55. <https://doi.org/10.1128/AAC.01199-13>.
- McLendon, Patrick M., Katye M. Fichter, et Theresa M. Reineke. 2010. « Poly(Glycoamidoamine) Vehicles Promote PDNA Uptake through Multiple Routes and Efficient Gene Expression via Caveolae-Mediated Endocytosis ». *Molecular Pharmaceutics* 7 (3): 738-50. <https://doi.org/10.1021/mp900282e>.
- Mochizuki, Kazufumi, et Martin Gorovsky. 2004. « Conjugation-specific small RNAs in *Tetrahymena* have predicted properties of scan (scn) RNAs involved in genome rearrangement ». 2004. <http://genesdev.cshlp.org/content/18/17/2068.short>.
- Moon, Eun-Kyung, Yeonchul Hong, Dong-Il Chung, Youn-Kyoung Goo, et Hyun-Hee Kong. 2014. « Down-Regulation of Cellulose Synthase Inhibits the Formation of Endocysts in *Acanthamoeba* ». *The Korean Journal of Parasitology* 52 (2): 131-35. <https://doi.org/10.3347/kjp.2014.52.2.131>.
- Neff, R. J., et R. H. Neff. 1969. « The Biochemistry of Amoebic Encystment ». *Symposia of the Society for Experimental Biology* 23: 51-81.

- Nguyen, Lap Thi, Kazutaka Atobe, Jose Mario Barichello, Tatsuhiro Ishida, et Hiroshi Kiwada. 2007. « Complex Formation with Plasmid DNA Increases the Cytotoxicity of Cationic Liposomes ». *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 30 (4): 751-57. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.751>.
- Ocadiz-Ruiz, Ramon, Wendy Fonseca, Alicia S. Linford, Timothy Yoshino, Esther Orozco, et Mario Rodriguez. 2016. « The knockdown of each component of the cysteine proteinase-adhesin complex of *Entamoeba histolytica* (EhCPADH) affects the expression of the other complex element as well as the in vitro and in vivo virulence | Parasitology | Cambridge Core ». 2016. <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/knockdown-of-each-component-of-the-cysteine-proteinaseadhesin-complex-of-entamoeba-histolytica-ehcpadh-affects-the-expression-of-the-other-complex-element-as-well-as-the-in-vitro-and-in-vivo-virulence/5D00F5B9A54935767454DDA1FBC42FAC>.
- Ocadiz-Ruiz, Ramon, Wendy Fonseca, Maximo Martinez, Ramon Ocadiz-Quintanar, Esther Orozco, et Mario Rodriguez. 2013. « Effect of the silencing of the Ehcp112 gene on the in vitro virulence of *Entamoeba histolytica* | Parasites & Vectors | Full Text ». 2013. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-6-248>.
- Orfeo, T., et E. Bateman. 1998. « Transcription by RNA Polymerase II during *Acanthamoeba* Differentiation ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1443 (3): 297-304. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(98\)00227-9](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(98)00227-9).
- Pak, Julia, et Andrew Fire. 2007. « Distinct Populations of Primary and Secondary Effectors During RNAi in *C. elegans* | Science ». 2007. <https://science.sciencemag.org/content/315/5809/241>.
- Peng, Zhihua, Romaica Omaruddin, et Erik Bateman. 2005. « Stable Transfection of *Acanthamoeba Castellanii* ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1743 (1): 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.08.014>.
- Peragine, Angela, Manabu Yoshikawa, Gang Wu, Heidi L. Albrecht, et R. Scott Poethig. 2004. « SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 Are Required for Juvenile Development and the Production of Trans-Acting siRNAs in *Arabidopsis* ». *Genes & Development* 18 (19): 2368-79. <https://doi.org/10.1101/gad.1231804>.
- Petropolis, Debora, Daniela Faust, Gagan Deep Jhingan, et Nancy Guillen. 2014. « A New Human 3D-Liver Model Unravels the Role of Galectins in Liver Infection by the Parasite *Entamoeba histolytica* ». 2014. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4161482/>.
- Pierrat, Philippe, Rongrong Wang, Dimitri Kereselidze, Marie Lux, Pascal Didier, Antoine Kichler, Françoise Pons, et Luc Lebeau. 2015. « Efficient in Vitro and in Vivo Pulmonary Delivery of Nucleic Acid by Carbon Dot-Based Nanocarriers ». *Biomaterials* 51 (mai): 290-302. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.017>.
- Rodríguez-Zaragoza, S. 1994. « Ecology of Free-Living Amoebae ». *Critical Reviews in Microbiology* 20 (3): 225-41. <https://doi.org/10.3109/10408419409114556>.
- Rolland, Steven, Luce Mengue, Cyril Noël, Stéphanie Crapart, Anne Mercier, Willy Aucher, Yann Héchard, et Ascel Samba-Louaka. 2020. « Encystment Induces Down-Regulation of an Acetyltransferase-Like Gene in *Acanthamoeba castellanii* ». *Pathogens* 9 (5). <https://doi.org/10.3390/pathogens9050321>.
- Ruby, J. Graham, Calvin Jan, Christopher Player, Michael J. Axtell, William Lee, Chad Nusbaum, Hui Ge, et David P. Bartel. 2006. « Large-Scale Sequencing Reveals 21U-RNAs and Additional MicroRNAs and Endogenous siRNAs in *C. Elegans* ». *Cell* 127 (6): 1193-1207. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.040>.
- Schuster, Frederick L., et Govinda S. Visvesvara. 2004. « Free-Living Amoebae as Opportunistic and Non-Opportunistic Pathogens of Humans and Animals ». *International Journal for Parasitology* 34 (9): 1001-27. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.06.004>.
- Sijen, Titia, Florian Steiner, Karen Thijssen, et Ronald Plasterk. 2007. « Secondary siRNAs Result from Unprimed RNA Synthesis and Form a Distinct Class | Science ». 2007. <https://science.sciencemag.org/content/315/5809/244>.
- Simpson, A.G.B., et Y. Eglit. 2016. « Protist Diversification ». In *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, 344-60. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800049-6.00247-X>.

- Sinard, JH, et Thomas D. Pollard. 1989. « The effect of heavy chain phosphorylation and solution conditions on the assembly of Acanthamoeba myosin-II. | Journal of Cell Biology | Rockefeller University Press ». 1989. <https://rupress.org/jcb/article/109/4/1529/28727/The-effect-of-heavy-chain-phosphorylation-and>.
- Solis, Carlos, Julien Santi-Rocca, Doranda Perdomo, Christian Weber, et Nancy Guillen. 2009. « Use of Bacterially Expressed dsRNA to Downregulate Entamoeba histolytica Gene Expression ». 2009. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2793006/>.
- Stanley, Samuel L. 2003. « Amoebiasis ». *The Lancet* 361 (9362): 1025-34. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12830-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12830-9).
- Stanojic, Slavica, Sylvie Gimenez, Emmanuelle Permal, François Cousserans, Hadi Quesneville, Philippe Fournier, et Emmanuelle d'Alençon. 2011. « Correlation of LNCR rasiRNAs Expression with Heterochromatin Formation during Development of the Holocentric Insect Spodoptera frugiperda ». *PLoS ONE* 6 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024746>.
- Taylor, Stephanie, Leena Ahonen, Frans de Leij, et Jeremy Dale. 2003. « Infection of Acanthamoeba castellanii with Mycobacterium bovis and M. bovis BCG and Survival of M. bovis within the Amoebae | Applied and Environmental Microbiology ». 2003. <https://aem.asm.org/content/69/7/4316.short>.
- Thomas, Jacqueline, et Nicholas Ashbolt. 2011. « Do Free-Living Amoebae in Treated Drinking Water Systems Present an Emerging Health Risk? | Environmental Science & Technology ». 2011. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es102876y>.
- Tolia, Niraj H., et Leemor Joshua-Tor. 2007. « Slicer and the Argonautes ». *Nature Chemical Biology* 3 (1): 36-43. <https://doi.org/10.1038/nchembio848>.
- Trabelsi, H., F. Dendana, A. Sellami, H. Sellami, F. Cheikhrouhou, S. Neji, F. Makni, et A. Ayadi. 2012. « Pathogenic Free-Living Amoebae: Epidemiology and Clinical Review ». *Pathologie Biologie* 60 (6): 399-405. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2012.03.002>.
- Tuschl, Thomas, Phillip D. Zamore, Ruth Lehmann, David P. Bartel, et Phillip A. Sharp. 1999. « Targeted mRNA Degradation by Double-Stranded RNA in Vitro ». *Genes & Development* 13 (24): 3191-97.
- Ullu, Elisabetta, Christian Tschudi, et Tirtha Chakraborty. 2004. « RNA interference in protozoan parasites - Ullu - 2004 - Cellular Microbiology - Wiley Online Library ». 2004. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-5822.2004.00399.x>.
- Valencia-Sanchez, Marco Antonio, Jidong Liu, Gregory J. Hannon, et Roy Parker. 2006. « Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs ». 2006. <http://genesdev.cshlp.org/content/20/5/515.short>.
- Varghese, Sneha Susan, et Sudip Kumar Ghosh. 2020. « Stress-responsive Entamoeba topoisomerase II: a potential antiamebic target - Varghese - 2020 - FEBS Letters - Wiley Online Library ». 2020. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1873-3468.13677>.
- Wan, Ning, Yi-Yang Jia, Yi-Lin Hou, Xi-Xi Ma, Yong-Sheng He, Chen Li, Si-Yuan Zhou, et Bang-Le Zhang. 2016. « Preparation, Physicochemical Properties, and Transfection Activities of Tartaric Acid-Based Cationic Lipids as Effective Nonviral Gene Delivery Vectors ». *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 39 (7): 1112-20. <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00007>.
- Wang, Tao, Leon M. Larcher, Lixia Ma, et Rakesh N. Veedu. 2018. « Systematic Screening of Commonly Used Commercial Transfection Reagents towards Efficient Transfection of Single-Stranded Oligonucleotides ». *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* 23 (10). <https://doi.org/10.3390/molecules23102564>.
- Whan, Lynne, Irene R. Grant, et Michael T. Rowe. 2006. « Interaction between Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis and Environmental Protozoa ». *BMC Microbiology* 6 (1): 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-63>.
- Whitehead, Kathryn A., Robert Langer, et Daniel G. Anderson. 2009. « Knocking down Barriers: Advances in siRNA Delivery ». *Nature Reviews Drug Discovery* 8 (2): 129-38. <https://doi.org/10.1038/nrd2742>.

Wong, AJ, T. D. Pollard, et IM Herman. 1983. « Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells in vivo | Science ». 1983. <https://science.sciencemag.org/content/219/4586/867>.

ANNEXE I

Etat de l'art des techniques de transfection et de sous-expression de gène chez les amibes

Technique de transfection	Type d'ARN interférents	Organismes	Références
Transfection avec un plasmide par électroporation	shRNA	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Baviskar et Shields 2011
	RNA antisens	<i>Entamoeba histolytica</i>	Aslam <i>et al.</i> 2012
	dsRNA	<i>Giardia</i>	Marcial-Quino <i>et al.</i> 2017
Transfection par phagocytose (bactérie exprimant dsRNA)	dsRNA	<i>Entamoeba histolytica</i>	Solis <i>et al.</i> 2009
	dsRNA	<i>Neoparamoeba</i>	Lima <i>et al.</i> 2015
Transfection par « soaking » (incubation en présence des ARN interférents)	dsRNA	<i>Entamoeba histolytica</i>	Lopez-Rosas <i>et al.</i> 2012
	siRNA	<i>Entamoeba histolytica</i>	Ocadiz-Ruiz <i>et al.</i> 2013
	siRNA	<i>Entamoeba histolytica</i>	Dominguez-Fernandez <i>et al.</i> 2018
Transfection par vecteur chimique (réactif de transfection)	dsRNA	<i>Entamoeba histolytica</i>	Varghese et Ghosh 2020
	siRNA	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Lorenzo-Morales <i>et al.</i> 2005
	siRNA	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Dudley <i>et al.</i> 2008
	shRNA	<i>Entamoeba histolytica</i>	Linford <i>et al.</i> 2009
	dsRNA	<i>Naegleria fowleri</i>	Jung <i>et al.</i> 2008
	siRNA	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Lorenzo-Morales <i>et al.</i> 2010
	siRNA	<i>Entamoeba histolytica</i>	Petropolis <i>et al.</i> 2014
	siRNA	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Martín-Navarro <i>et al.</i> 2014
	shRNA	<i>Entamoeba histolytica</i>	Ocadiz-Ruiz <i>et al.</i> 2016
siRNA	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	Bekliz <i>et al.</i> 2018	

RESUME

Les amibes libres sont des organismes capables de passer d'une forme active, le trophozoïte, à une forme de dormance, le kyste, afin de résister à des conditions environnementales qui leurs seraient défavorables. Les voies de signalisation de ce processus restent peu connues. Un outil génétique, l'interférence à l'ARN, permettrait de moduler l'expression de gènes chez l'amibe modèle *Acanthamoeba castellanii*, comme cela a déjà été réalisé précédemment dans différentes études. La modulation de l'expression de ces gènes permettrait l'étude de leur fonction. L'objectif de ce stage était d'adapter un protocole de siRNA en utilisant comme gène cible, la cellulose synthase, pour lequel il a été montré que l'expression augmente pendant le processus d'enkystement. Bien que la première étape, l'internalisation de siRNA dans la cellule, a été constatée, l'expression de la cellulose synthase n'a pas pu être diminuée. Différents points critiques liés à cet outil génétique restent à optimiser.

Mots-clés : *Acanthamoeba castellanii*, enkystement, interférence à l'ARN, cellulose synthase.

ABSTRACT

Free-living amoeba are organisms capable of changing from a vegetative form, the trophozoite, to a dormant form, the cyst, under stressful environmental conditions. The signalling pathways of this process remain poorly understood. RNA interference is a genetic tool that would allow to modulate the expression of genes in the amoeba model *Acanthamoeba castellanii*, as it has already been performed in previous studies. Modulation of these genes expressions would allow the study of their function. The objective of this internship was to adapt a siRNA protocol using cellulose synthase as the target gene, for which it was shown that expression increases during the encystation process. Although the first step, internalization of siRNA in the cell, was observed, cellulose synthase expression was not down-regulated. Several critical points related to this genetic tool remain to be optimized.

Key words: *Acanthamoeba castellanii*, encystation, RNA interference, cellulose synthase.