

5
gu 20104060
N° d'ordre:

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE
LILLE FLANDRES-ARTOIS**

THÈSE DE DOCTORAT

présentée à l'université de Lille I pour l'obtention du titre de

Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

par

YAHIAOUI Bilel

**Clonage et caractérisation moléculaire d'un ADNc de
Leishmania major codant pour une protéine
homologue au produit du gène *SIR2* de *Saccharomyces
cerevisiae*.**



Soutenue le 28 Septembre 1995 devant la commission d'examen

Membres du jury:

Président:

Professeur A. Dhainaut

Rapporteurs:

Dr. J. F. Dubremetz

Dr. M. Pages

Examineurs:

Dr. J. L. Lemesre

Dr. M. A. Ouaisi



Je dédie ce mémoire

à mes parents, pour tout l'amour et le soutien qu'ils m'ont apporté

à ma soeur Roubila et à tous les membres de ma famille

à Delphine

L'ensemble de ce travail a été réalisé au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire (Institut Pasteur de Lille), dans le groupe de recherche sur les *Trypanosomatidae*, animé par Monsieur le Dr. M.A. Ouaisi, initialement dans l'unité mixte INSERM 167-CNRS 624 dirigé par Monsieur le Pr. A. Capron, puis, dans L'unité INSERM 415 sous la direction de Monsieur le Dr. J.C. Ameisen.

Avec la participation financière des organismes suivants:

1. L'INSERM
2. L'Institut Pasteur de Lille
3. Le CROUS de Lille
4. Le ministère de la coopération de la république Française
5. Le ministère délégué aux Universités de la république Algérienne.

Remerciements

A Monsieur le Professeur A. DHAINAUT,

Vous me faites aujourd'hui l'honneur de bien vouloir présider cette thèse. Qu'il me soit permis de vous exprimer ma profonde gratitude.

A Monsieur le Docteur M.A. Ouaisi

Vous m'avez accueilli avec bienveillance, conseillé et encouragé avec enthousiasme tout au long de ces années passées dans votre équipe. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de toute mon amitié.

A Monsieur le Docteur J.F. Dubremetz

Vous avez suivi ce travail et accepté de le juger spontanément. Qu'il me soit permis de vous exprimer mes très sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur M. Pages

Vous vous êtes intéressé à mon travail et avez accepté de le juger. Veuillez trouver ici l'expression de mes plus vifs remerciements

A Monsieur le Docteur J.L. Lemesre

Vous avez tout de suite accepté de juger ce travail. Soyez en chaleureusement remercié.

Je tiens également à remercier:

Monsieur le Docteur **A. Taibi** pour sa collaboration scientifique dans ce travail, pour son amitié et le soutien moral qu'il m'a apporté durant mes moments difficiles. Je tiens à lui exprimer ma très profonde reconnaissance.

Monsieur le **Dr. R. Schöneck** et **Mr. M. Loyens** qui ont su me faire bénéficier de leur grande compétence technique. Qu'ils soient assurés de toute ma gratitude et ma sincère amitié.

Les membres du groupe de recherche sur les *Trypanosomatidae*, **Mr R. Fernandez-Gomez**, **Mme O. Billaut-Mulot** et **Mr A. Guevara Espinosa** pour leur amitié et tous les bons moments passés ensemble.

Monsieur et Madame Ameisen qui ont manifesté à mon égard une gentillesse peu commune et fait preuve d'une aide efficace. Qu'ils soient assurés de ma profonde estime.

Je n'oublierai certainement pas tous les membres du personnel du CIBP, ainsi que le corps étudiant, qui m'ont témoigné une amitié sans précédent et m'ont beaucoup aidé durant ces quatre années que j'ai passé parmi eux. Je tiens à leur exprimer ma très profonde reconnaissance et les assurer de ma sincère amitié.

Publications

YAHIAOUI, B., LOYENS, M., TAIBI, A., SCHÖNECK, R., DUBREMETZ, J.F. & OUAISSI, M.A. (1993). Characterisation of *Leishmania* antigen associated with cytoplasmic vesicles resembling endosomal-like structure. *Parasitology* . **107**. 497-507.

YAHIAOUI, B., TAIBI, A.,& OUAISSI, M.A. (1995). A *Leishmania major* protein with extensive homology to Silent Information Regulatory 2 of *Saccharomyces cerevisiae* *Gene*. Sous-presse.

TAIBI, A., GUEVARA-ESPINOZA, A., SCHÖNECK, R., **YAHIAOUI, B.** and OUAISSI, M.A. (1995). Improved specificity of *Trypanosoma cruzi* identification by polymerase chain reaction using an oligonucleotide derived from the amino-terminal sequence of a Tc24 protein. *Parasitology*. Sous-presse.

Abréviations

ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADNc:	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNk:	Acide désoxyribonucléique kinétoplastique
ARNg:	Acide ribonucléique guide
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
ARNr:	Acide ribonucléique ribosomal
ARS:	Séquence de replication autonome
pb:	Paires de base
BCG:	Bacille de Calmette et Guérin
CMI:	Immunité à médiation cellulaire
CNDP:	1-chloro-2-4-dinitrobenzene
COIII:	Cytochrome oxydase III
cpm:	Coups par minute
CR:	Récepteur du complément
dNTP:	Désoxyribonucléotide-triphosphate
DTH:	Hypersensibilité retardée
eEF:	Facteur d'élongation eucaryotique de la synthèse protéique
FnR:	Récepteur de la fibronectine
gp63:	Glycoprotéine membranaire de 63 kDa
GSH:	Glutathion réduit
GST:	Glutathion S-transférase
HSP:	Protéine de choc thermique
INF-γ:	Interféron-γ
kb:	Kilobase
LmGbp:	Protéines de <i>L. major</i> ayant une affinité pour le glutathion
LPG:	Lipophosphoglycane

MAT:	Locus du type conjuguant (mating-type)
MBC:	Methyl-benzimidazol-2yl carbamate
MFR:	Récepteur mannose-fucose
<i>néo:</i>	Gène de la résistance à la néomycine
nt:	Nucléotide
ORC:	Complexe protéique reconnaissant les origines de réplication
ORF:	Séquence à cadre de lecture ouvert
OVA:	Ovalbumine
PARP:	"Procyclic acid repetitive protein"
PMSF:	Fluorure de Phényl Méthyl Sulfonyle
RAP1:	Protéine à fonction activatrice et inhibitrice de l'expression des gènes chez la levure
RFLP(s):	Abréviation communément employée pour désigner les polymorphismes de restriction de l'ADN
RI:	Régions intergéniques
SDS:	Sodium dodécylsulfate
SIR1-4:	"Silent Information Regulator 1-4", protéines impliquées dans le maintien de l'état silencieux de certains gènes de la levure.
UTR(s):	Séquences d'ADN non transcrites
VIH:	Virus de l'immunodéficience acquise chez l'homme
VSG:	Glycoprotéines variables de surface

SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION.....	10
PRESENTATION DES LEISHMANIOSES.....	12
BUT DU TRAVAIL.....	61
TRAVAUX PERSONNELS.....	64
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	116
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	127
TABLE DES MATIERES.....	152

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les leishmanioses sont des zoonoses transmissibles à l'homme, dues à plusieurs espèces d'un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*. On estime à 12 000 000 le nombre de personnes atteintes de par le monde et 400 000 nouveaux cas sont recensés chaque année. Les leishmanioses sont endémiques dans 97 pays (Ashford et coll., 1992). Ces chiffres font de la leishmaniose un problème majeur de santé publique, d'une part dans les pays du tiers monde et d'autre part dans les pays développés, notamment en Europe du sud où cette affection est considérée comme une maladie opportuniste chez les sujets immunodéprimés. Trois cents cas de double infection VIH/*Leishmania* ont été recensés depuis une dizaine d'année (Alvar., 1994). Les leishmanioses se présentent sous trois différents tableaux cliniques: les leishmanioses cutanées, la leishmaniose cutanéomuqueuse et les leishmanioses viscérales. Néanmoins, toutes les leishmanioses sont transmises par la femelle d'un insecte vecteur appartenant aux genres *Phlebotomus* (dans l'ancien-monde) et *Lutzomyia* (dans le nouveau-monde). Toutes les espèces sont intracellulaires chez l'hôte vertébré. Elles infectent les macrophages et se multiplient à l'intérieur d'une vacuole parasitophore sous une forme non flagellée appelée amastigote. Les réservoirs animaux des espèces pathogènes pour l'homme sont le chien et les rongeurs.

Les *Leishmania* sont exposées à divers facteurs de "stress", et ceci à tous les stades du cycle évolutif. Les conditions de vie chez le vecteur diffèrent nettement de celles rencontrées chez l'hôte vertébré. La survie du parasite et la transition d'un milieu à un autre sont facilitées par la tolérance d'une variation de pH et de température, d'une résistance à la lyse par le complément, par un changement qualitatif ou quantitatif des molécules de surface, et de façon générale par la morphogenèse qui se traduit par la transformation du promastigote en amastigote et *vice versa*. Tous ces phénomènes sont sous le contrôle d'une expression différentielle des gènes selon le stade parasitaire considéré. Cette régulation définit la base de la virulence de la plupart des protozoaires parasites.

Contrairement aux eucaryotes supérieurs, la régulation de l'expression des gènes est probablement post-transcriptionnelle chez les *Leishmania* et les *Kinetoplastida* en général. Ces organismes possèdent deux mécanismes originaux de maturation de l'ARNm, le trans-épissage, lui-même couplé à la polyadénylation, et "l'édition" de l'ARNk. Si actuellement on est capable de montrer que tel gène est plus exprimé à un stade qu'à un autre, et que telle séquence est nécessaire pour la maturation des ARNm des leishmanies, aucun site d'ADN pouvant jouer le rôle de promoteur ou de silenceur chez les *Leishmania* n'a été identifié à ce jour, ainsi que les facteurs qui se fixeraient sur ces sites pour favoriser ou gêner le travail des ARN polymérases (facteurs de transcription et/ou facteurs de répression).

La démonstration de l'existence de tels mécanismes permettra de mieux comprendre la biologie des *Leishmania*. L'identification des bases moléculaires des modifications morphologiques, physiologiques et biochimiques qui caractérisent les différentes étapes du développement de ces organismes, permettra de mieux contrôler les maladies dont ils sont responsables.

1. PRESENTATION DES LEISHMANIOSES

1.1. Historique

Les agents pathogènes des leishmanioses furent décrits la première fois par Borowsky en 1900, pour la leishmaniose cutanée de l'ancien monde. Puis en 1903 en même temps par Leishman et Donovan pour le Kala-Azar de l'Inde, et enfin Vianna en 1911 a décrit l'agent responsable de la forme cutanéomuqueuse sud-américaine. En 1908, Charles Nicolle fut le premier à démontrer à Tunis le caractère zoonotique de ces maladies. En effet, il a noté la sensibilité expérimentale et l'infection spontanée du chien. Le rôle du phlébotome comme agent vecteur des leishmanioses fut démontré expérimentalement sur des volontaires à Alger en 1921, puis en 1922 par Adler. Le développement du parasite

dans le tube digestif du phlébotome a été démontré en 1924 par Knowles et ses collaborateurs (Réfs, cf. Kean, Mott et Russel., 1978)

1.2. Répartition géographique des leishmanioses

Les foyers des leishmanioses sont nombreux et largement répandus à travers le monde (Fig. 1). On distingue six foyers principaux.

1.2.1. Le foyer méditerranéen

Il intéresse tout le littoral méditerranéen depuis le midi de la France jusqu'à l'Afrique du nord et de la péninsule ibérique jusqu'au Moyen-Orient. On y rencontre aussi bien des leishmanioses cutanées que des leishmanioses viscérales.

1.2.2. Le foyer indien

Il comprend l'Inde, le Pakistan, le Bangladesh, le Sri Lanka, la Birmanie, la Thaïlande, accessoirement l'Indochine et l'Indonésie. Les leishmanioses viscérales sont dominantes.

1.2.3. Le foyer chinois

Il s'étend au nord-est du pays. Il s'agit principalement du Kala-Azar.

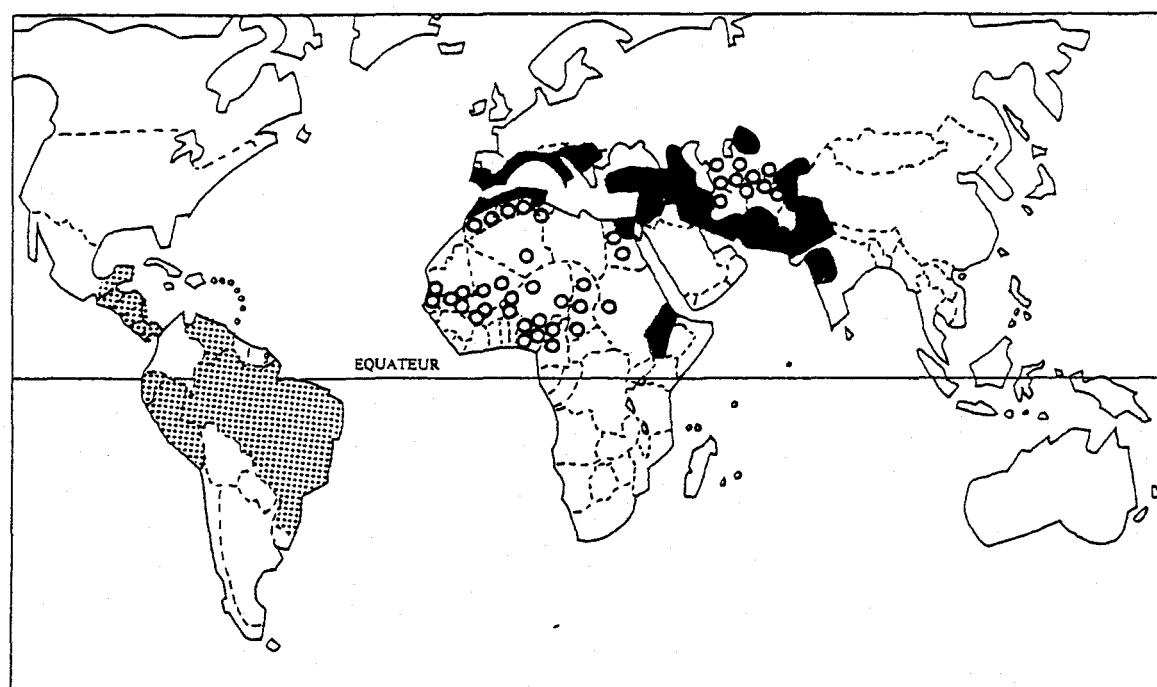
1.2.4. Le foyer d'Asie centrale

Il recouvre l'Anatolie, les hauts plateaux iraniens, l'Afghanistan, l'Asie centrale et méridionale russe. Les formes cutanées y prédominent.

1.2.5. Le foyer d'Afrique tropicale

Ce foyer s'est avéré plus important qu'on ne le pensait. Des leishmanioses viscérales et cutanées ont été rapportées en Afrique centrale, sur les rives du lac Tchad, au Congo, en

FIGURE N°1: RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE DES LEISHMANIOSES



- Bouton d'Orient forme sèche
- ◐ Leishmaniose cutanéomuqueuse du Nouveau-Monde
- ◉ Bouton d'Orient forme humide

Fig.1.1: Répartition géographique des leishmanioses cutanées.

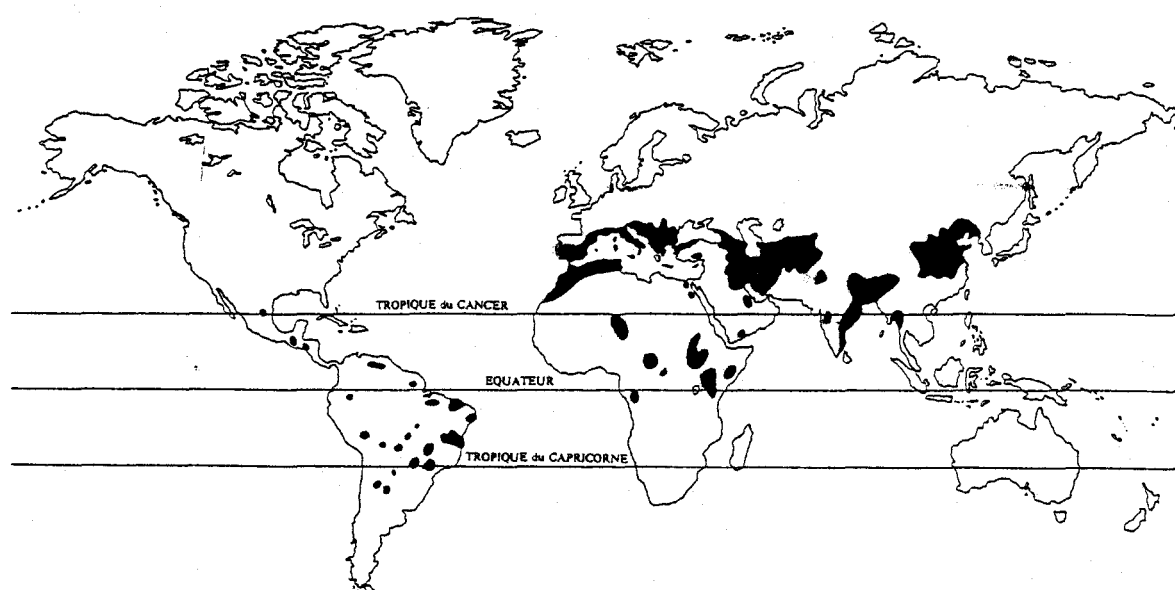


Fig.1.2: Répartition mondiale de la leishmaniose viscérale humaine.

Afrique orientale (Soudan, Éthiopie, Kenya, République du Djibouti) et en Afrique occidentale (Sénégal, Mali).

1.2.6. Le foyer sud-américain

Ce foyer est centré sur le Brésil, s'étend du Mexique au nord de l'Argentine; quelques cas ont été signalés aux Antilles (Martinique). Les leishmanioses américaines sont cutanées, cutanéomuqueuses et viscérales.

1.3. Les parasites

Les leishmanies sont des protozoaires flagellés de l'ordre des *Kinetoplastida* et de la famille des *Trypanosomatidae*. Parasites dimorphiques, ils présentent chez leur hôtes successifs deux stades morphologiques distincts: le stade promastigote dans le tube digestif du phlébotome et le stade amastigote intracellulaire chez l'hôte vertébré. La forme promastigote est un organisme allongé, très mobile, mesurant 15 à 20 μm de longueur et 1,5 à 3,5 μm de large. L'extrémité antérieure d'où s'échappe un flagelle libre est arrondie, alors que l'extrémité postérieure est effilée. Le noyau est approximativement central et le kinétoplaste situé en position antérieure (Walters et coll., 1989a; 1989b). Le stade amastigote est un petit corpuscule qui parasite les cellules histio-monocytaires de l'hôte vertébré, il est de forme ovoïde ou arrondi et mesure 2 à 6 μm . L'amastigote possède un gros noyau central, un kinétoplaste et une petite ébauche de flagelle rudimentaire (Chang et coll., 1985). Les espèces et sous-espèces majeures causant la maladie chez l'homme sont résumées dans le tableau n°1.

1.4. Les vecteurs

Les phlébotomes sont des petits insectes diptères appartenant à la famille des *Psychodidae*. Ils sont velus, de couleur claire, et mesurent 2 à 3 mm de longueur. Ce sont

Tableau n°1: Les principales espèces de *Leishmania* responsables de la maladie chez l'homme.

Espèces	Sous-espèces	Distribution	Manifestation clinique	Guérison spontanée
<i>L. donovani</i>	<i>L. d. donovani</i>	Ancien-monde	LV	Non
	<i>L. d. infantum</i>	Ancien-monde	LV/LC	Non
	<i>L. d. chagasi</i>	nouveau-monde	LV	Non
<i>L. major</i>		Ancien-monde	LC	Rapide
<i>L. tropica</i>		Ancien-monde	LC/LR	Lente/Non
<i>L. aethiopica</i>		Ancien-monde	LC/LCD	Lente/Non
<i>L. braziliensis</i>	<i>L. b. braziliensis</i>	nouveau-monde	LCM/LC	Non/Oui
	<i>L. b. guyanensis</i>	nouveau-monde	LC	Oui
	<i>L. b. panamensis</i>	nouveau-monde	LC/LCM	Non/Oui
	<i>L. b. peruviansis</i>	nouveau-monde	LC	Généralement
<i>L. mexicana</i>	<i>L. m. mexicana</i>	nouveau-monde	LC	Variable
	<i>L. m. amazonensis</i>	nouveau-monde	LC/LCD/LV	Variable/Non
	<i>L. m. pifanoi</i>	nouveau-monde	LC/LCD	Variable/Non

D'après Alexander et Russel, (1992).

LC, leishmanioses cutanées; LCD, leishmanioses cutanées diffuses; LR, leishmanioses récidivantes; LCM leishmanioses-cutané-muqueuses; LV, leishmanioses viscérales.

des insectes à activité crépusculaire et nocturne, dont le développement (oeuf, 4 stades larvaire et nymphe) se déroule dans la terre humide. Seule la femelle est hématophage, donc responsable de la transmission de la leishmaniose. Ces insectes abondent toute l'année en zone intertropicale, mais n'apparaissent qu'en belle saison dans les régions tempérées où ils confèrent à la maladie un caractère saisonnier. On estime à 600 le nombre d'espèces de phlébotomes de part le monde, dont seulement une vingtaine parmi elles, appartenant aux genres *Phlebotomus* dans l'Ancien-Monde et *Lutzomyia* dans le Nouveau-Monde, sont prouvées comme vectrices des leishmanioses (Dedet., 1986).

1.5. Cycle évolutif des leishmanies

La circulation du parasite dans la nature se fait par passage alternatif de l'hôte vertébré au vecteur et vice versa (Fig. 2). Les leishmanies parasitent les cellules histiomonocytaires qu'elles distendent. Elles se présentent sous la forme amastigote à l'intérieur des macrophages au niveau des lésions cutanées, ou de ceux des organes profonds (rate, foie, moelle osseuse et ganglions) dans le cas de la leishmaniose viscérale. L'entrée des *Leishmania* à l'intérieur des macrophages est due principalement à l'activité phagocytaire de la cellule hôte. Les parasites sont intériorisés dans une vacuole de phagocytose qui fusionne secondairement avec des lysosomes pour former le phagolysosome ou vacuole parasitophore. La forme amastigote semble résistante aux hydrolases lysosomiales, et se trouve ainsi à l'abri des facteurs sériques spécifiques (anticorps) ou non (complément) et à l'attaque des cellules tueuses. Les amastigotes se multiplient par fission binaire dans les cellules du système des phagocytes mononucléés qui finiront par éclater. Les parasites libérés vont ainsi infecter d'autres cellules saines. Le phlébotome femelle s'infeste en piquant un individu atteint de leishmaniose. Le repas sanguin infectant amène dans le tube digestif des parasites au stade amastigote. Au niveau de la partie postérieure de l'intestin moyen (le mésentéron), le parasite va subir plusieurs divisions sous cette forme (43 h après l'infestation), avant de se transformer en promastigote (Lainson et coll., 1987). Brun

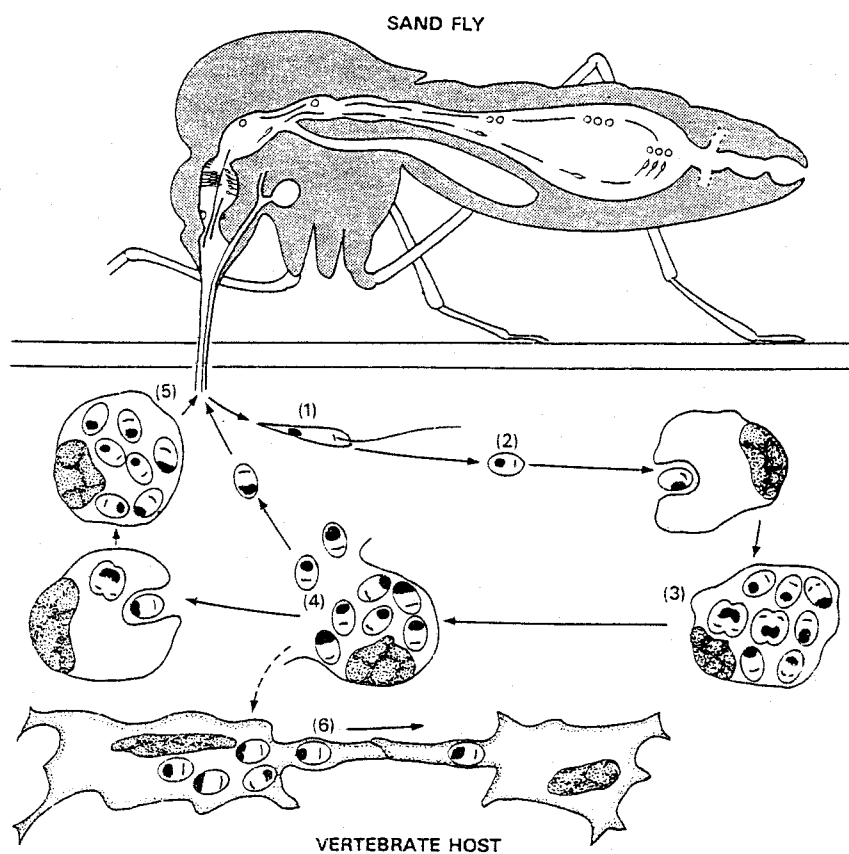


FIGURE N° 2: CYCLE EVOLUTIF DES LEISHMANIES CHEZ LE VECTEUR ET CHEZ L'HÔTE VERTEBRE.

Les promastigotes (1) injectés par le phlébotome, pénètrent dans les macrophages dans lesquels ils vont se transformer en amastigotes. Ces derniers vont se multiplier par fission binaire et former des nids cellulaires parasitaires (2 à 5). Parfois, les amastigotes peuvent passer dans les cellules filles issues de la mitose d'une cellule infectée (6). (D'après Geigy & Herbig, 1955).

et coll, (1976) ont suggéré que le repas sanguin contient des facteurs inhibiteurs de la transformation, dont l'action sera abolie lorsque les enzymes digestives du vecteur les dégraderont. Au bout d'une semaine, le phlébotome pourra transmettre la maladie lors d'un repas sanguin. L'infestation de l'hôte vertébré se fera à travers la plaie par régurgitation des parasites.

1.6. Les différentes formes de la leishmaniose

On distingue trois formes de leishmanioses, la viscérale, la cutanée et la cutanéomuqueuse.

1.6.1. La leishmaniose viscérale

La leishmaniose viscérale apparaît comme strictement humaine en Inde et se présente ailleurs comme une zoonose des canidés. Le comportement trophique du vecteur conditionne le cycle épidémiologique. Le parasitisme du système des phagocytes mononucléés affecte préférentiellement et de façon intense les organes majeurs de ce système: moelle osseuse, rate et foie, mais l'hyperplasie atteint l'ensemble du système lymphoïde.

1.6.1.1. Signes cliniques

L'incubation est silencieuse, dure un à deux mois, parfois davantage. Au niveau du point de piqûre du phlébotome, apparaît un chancre d'inoculation vésiculo-palpeux, toujours discret, fugace, facilement négligé. Les manifestations cliniques essentielles de la maladie sont représentées par la classique triade symptomatique: fièvre élevée et ondulante, pâleur, et splénomégalie. Une hépatomégalie modérée est courante, ainsi que des micro-polyadénopathies. La pâleur traduit l'anémie et en Inde le Kala-Azar s'accompagne d'une coloration brun foncée des téguments. L'amaigrissement des membres et du thorax dans le cas de la leishmaniose viscérale de l'enfant contraste avec la dilatation abdominale. Parfois, on observe des signes digestifs et des manifestations hémorragiques.

1.6.1.2. Signes biologiques

L'hémogramme et l'étude des protéines sériques indiquent une anémie normochrome normocytaire. La leucopénie avec neutropénie est constante et parfois très constante, elle s'associe à la thrombopénie et participe à la pancytopénie de la leishmaniose viscérale.

Le protidogramme indique une hypergammaglobulinémie chez l'adulte, souvent abaissée chez l'enfant. On note une inversion du rapport albumine/globulines.

La leishmaniose viscérale s'accompagne d'une augmentation des lymphocytes B circulants et d'une importante production d'immunoglobuline G due à une activation polyclonale dont une proportion est spécifique aux antigènes parasitaires, cependant le taux des Ig M est peu modifiés. La leishmaniose viscérale s'accompagne aussi d'une dépression de l'immunité cellulaire, avec absence de réaction d'hypersensibilité retardée. A défaut de traitement, cette forme est souvent fatale pour le sujet atteint.

1.6.2. Les leishmanioses cutanées

On distingue sous ce terme une série d'affections dues à des espèces de *Leishmania* bien distinctes et d'épidémiologies différentes, mais toutes les formes cutanées ont en commun un certain nombre de caractéristiques cliniques.

1.6.2.1. Signes cliniques

Toutes les leishmanioses cutanées provoquent des lésions tégumentaires sans métastase muqueuse ni extension viscérale.

Après une période d'incubation d'environ 1 à 4 mois, la lésion débute sous forme d'une petite papule indurée, indolore, parfois prurigineuse. La papule augmente de taille et évolue progressivement vers la lésion définitive. Elle peut être unique ou multiple, et atteindre toutes les parties du corps, accessibles aux vecteurs. La lésion de la leishmaniose est bien limitée, à contour régulier, et le plus souvent arrondie ou ovale, de diamètre ne dépassant pas les 10 cm. Indolore, la lésion connaît une évolution chronique, aboutissant

le plus souvent à la guérison spontanée en quelques mois, voire plus d'un an. On peut distinguer cinq types de lésions cutanées:

- * L'un des types de lésions le plus fréquemment rencontré est l'ulcération à caractère creusant. De profondeur variable, à fond saigneux, elle est souvent recouverte d'une croûte résultant de la coagulation de la sérosité et qui part facilement après ramollissement. La bordure de la lésion est plus ou moins surélevée et inflammatoire et en général riche en parasites. Cette forme dite "humide" correspond à la majorité des lésions de leishmaniose cutanée zoonotique (Bouton d'Orient, clou de Biskra...) et de Pian bois, de Uta et de la forme amazonienne.

- * La forme dite "sèche" correspond à une lésion ecthymateuse recouverte de squames dont le grattage fournit des parasites. Ces lésions peuvent confluer en larges plaques couramment désignées sous le terme de forme pseudotuberculoides. C'est une lésion caractéristique de leishmaniose cutanée anthroponotique.

- * La forme pseudo-tumorale, de fréquence rare, se caractérise par la prolifération saillante et circonscrite d'une masse plus ou moins volumineuse, plus ou moins villeuse.

- * La forme nodulaire est caractérisée par une lésion fermée, nodulaire, indurée, et en général, localisée. La confluence des lésions infiltrées qui peuvent recouvrir l'ensemble du corps caractérise la leishmaniose cutanée diffuse (LCD). Cette forme diffuse est rencontrée chez les sujets immunodéprimés, parasités par *L. aethiopica* dans l'Ancien-Monde ou *L. m. amazonensis* et *L. m. pifanoi* dans le Nouveau-Monde. Ces formes graves sont rebelles aux traitements.

- * La lésion de *l'ulcère des gommiers* siège fréquemment au pavillon de l'oreille et elle peut attaquer le cartilage sous-jacent, aboutissant à des amputations partielles du pavillon de l'oreille.

Toutes ces formes cutanées (à l'exception de la LCD) évoluent en quelques mois, parfois en deux années, vers la guérison spontanée. Ces guérisons s'accompagnent d'une cicatrice indélébile souvent hyperpigmentée, et d'une protection immunitaire à la réinfection par l'espèce homologue.

1.6.2.2. Signes biologiques

La guérison spontanée de la plupart des leishmanioses cutanées est due à une réponse immunitaire à médiation cellulaire (CMI). la réponse humorale ne joue aucun rôle. La CMI est révélée par une forte hypersensibilité de type retardée (DTH) et une induction de prolifération des lymphocytes T *in vitro* par les antigènes parasitaires. Les patients atteints d'une LCD présentent un test négatif de DTH ou à tout autre test portant sur la réponse lymphocytaire aux antigènes leishmaniens. Par contre, ces patients présentent une réponse de type humorale non efficace.

1.6.3. La leishmaniose cutanéomuqueuse (Espundia)

Elle se caractérise par l'existence de véritables métastases tant cutanées que muqueuses. Elle apparaît parfois après la guérison de l'ulcère initial. Les métastases muqueuses sont graves et mutilantes (destructions tissulaires), elles atteignent surtout le nez, mais aussi l'oropharynx, l'oesophage et s'accompagnent de surinfections microbiennes. La pathogénie de cette forme est peu comprise, car la lésion initiale guérit spontanément et les patients présentent à la fois une DTH et des anticorps circulants.

1.7. Diagnostic des leishmanioses

1.7.1. Examens directs

Chez les patients où l'on suspecte une leishmaniose viscérale (LV), la recherche de formes parasitaires se fait sur des prélèvements de moelle osseuse au niveau du sternum ou à la crête iliaque chez le jeune enfant. On examine précisément les cellules histiomonocytaires. Les frottis sont colorés au May-Grünwald-Giemsa, puis examinés au microscope. Les leishmanies sont peu nombreuses, contenues dans de volumineuses cellules, ou semblent libres lorsque la cellule hôte a éclaté lors de l'étalement. La ponction splénique est contre-indiquée. Cet examen peut être complété par la mise en culture des prélèvements dans des milieux contenant du sang. Dans le cas des leishmanioses cutanées

(LC), les prélèvements sont réalisés à partir du suc dermique par grattage de la lésion à l'aide d'un vaccinostyle. Une autre méthode consiste à injecter dans la lésion quelques gouttes de sérum physiologique qui seront aussitôt réaspirées et étalées sur une lame d'observation.

1.7.2. Test d'hypersensibilité retardée

Ce test d'intradermoréaction a été mis au point par Montenegro en 1926, au Brésil. Il est très utilisé pour diagnostiquer les leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses où une forte réponse à médiation cellulaire est souvent observée. Les antigènes les plus courants sont constitués par des suspensions de promastigotes tués par la chaleur et phénolés (leishmanine). L'injection intradermique (0.1 à 0.2 ml) d'une suspension de parasites (6 à 10 millions par ml) provoque l'apparition d'une zone indurée. Le diamètre de la réaction est supérieur à 5 mm en cas de positivité (lecture à 48, voire 72 heures). Une réaction positive n'indique pas forcément une infection active, car le test est aussi positif pour les sujets qui ont eu la leishmaniose dans le passé. Ce cas de figure arrive souvent dans les régions endémiques, ce qui ôte au test de Montenegro toute valeur diagnostique dans ces régions.

L'utilisation d'extrait total parasitaire, pose un problème de réactions croisées, d'une part, avec des espèces différentes du genre *Leishmania*, et d'autres parts avec des agents pathogènes, tels que les mycobactéries et les trypanosomes. Aucun antigène spécifique d'espèce, susceptible d'être utilisé dans ce type de test, n'a été caractérisé.

1.7.3. Diagnostic immunologique

Les techniques immunologiques sont peu fiables dans le diagnostic des leishmanioses cutanées (LC). En effet, il a été constaté que ces techniques ne confirmaient pas 30% de LC fictives (El Safi et Evans., 1989). Cela est dû à la faible réponse humorale qu'induisent les LC chez les malades.

Par contre, ces techniques sont très fiables pour diagnostiquer les leishmanioses viscérales (LV) qui s'accompagnent d'une importante réponse humorale, donc de titres élevés d'anticorps spécifiques circulants. Trois techniques principales sont utilisées à plus ou moins grande échelle dans le diagnostic des LV. On distingue l'immunofluorescence indirecte (IFAT) (Badaro et coll., 1983), l'ELISA (Anthony et coll., 1980) et le test d'agglutination directe (DAT) (Harith et coll., 1986). Ces réactions utilisent l'extrait antigénique total préparé à partir de promastigotes de culture de *L. donovani* ou *L. infantum*, bien que les larges communautés antigéniques existant entre les espèces de *Leishmania* autorisent l'emploi de souches hétérologues. De plus, compte tenu des titres élevés d'anticorps spécifiques, associés aux LV, il est possible d'éviter les problèmes des réactions croisées en effectuant des dilutions très élevées du sérum.

1.7.4. Les sondes ADN spécifiques d'espèces

La cible des amorces ADN est le minicercle de l'ADN kinétoplastique (ADNk) qui représentent 10 à 25% de l'ADN cellulaire total. Le kinétoplaste contient 10 000 à 100 000 copies de ce minicercle. Les minicercles contiennent des séquences nucléotidiques répétées uniques ou spécifiques à chaque espèce de *Leishmania*. En effet, le minicercle d'ADNk isolé de *Leishmania braziliensis* ne possède aucune homologie significative avec l'ADNk de *Leishmania mexicana* (Wirth et McMahon-Pratt., 1982). Une sonde ADN peut différencier les espèces en appliquant directement l'échantillon de la lésion sur une feuille de nitrocellulose (Wirth et coll., 1986; Rogers et coll., 1988). Cette technique est appliquée à la fois pour diagnostiquer les LV et les LC (Smith et coll., 1989). L'hybridation *in situ* sur lame, en utilisant une sonde d'ADNk marquée, permet de détecter les parasites (Van et coll., 1987).

Parfois, dans les prélèvements de LV ou LCM (forme cutanéomuqueuse), les parasites sont peu nombreux, ce qui limite la sensibilité de la technique d'hybridation. Afin d'augmenter la sensibilité de détection des *Leishmania*, on procède à une amplification de l'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Une trentaine de cycles

(dénaturation, hybridation des amorces, puis élongation) permet d'amplifier la séquence d'ADN cible 10^6 fois. Les oligonucléotides utilisés comme amorces dans la PCR, permettent l'amplification de la séquence chez toutes les souches de *Leishmania*. La distinction entre les espèces se fera sur la base de l'hybridation de la sonde ADNk aux différent produits de PCR (Rodgers et coll., 1990). Le développement de techniques de marquage non radioactif des sondes ADN, telles que celles qui utilisent la digoxigénine ou la biotine, et la révélation des blots grâce à des enzymes qui catalysent une simple réaction de développement de couleur, facilite l'utilisation de cette technique dans les pays en voie de développement et sur le terrain.

1.8. Traitement

Il concerne les formes viscérales et les formes cutanéomuqueuses. Pour les autres, tout dépendra de la localisation de la lésion et son extension. Les principaux médicaments utilisés sont très toxiques pour l'homme et inefficaces chez les sujets immunodéprimés. Leurs mécanismes d'action restent encore à définir. (Réf, cf. Olliaro et Bryceson., 1993).

1.8.1. Antimoniés pentavalents

Le Glucantime[®] (ampoules de 5 ml dosées à 1.5 g), est le médicament de choix pour le traitement initial. Posologie progressivement croissante: 1/4 de dose, 1/2, 3/4 puis dose pleine (60 mg / kg / j) pendant 10 à 15 jours en intramusculaire.

Une cure de consolidation peut être nécessaire 4 à 6 semaines plus tard. Le traitement peut provoquer des effets secondaires tels que fièvre, toux quinteuse, myalgies, vomissement. Parfois une intoxication survient en fin de cure, accompagnée d'atteinte hépatorénale, de myocardite, et de polynévrite. Il convient donc de surveiller la créatinémie, l'existence de protéinurie et l'électrocardiogramme des patients.

1.8.2. Iséthionate de pentamidine

Le Pentacarinat^R (flacon contenant 300 mg). Posologie: 3 à 4 mg / kg, un jour sur deux, en 10 injections intramusculaires (IM) ou intraveineuses (IV). La perfusion dans du sérum glucosé est actuellement préférée à la voie IM. Son mode d'action est peu connu, mais on sait qu'il affecte l'ADNk mitochondrial. La surveillance de la glycémie, de la fonction rénale et de l'hémogramme est nécessaire.

1.8.3. Amphotéricine B

C'est un antibiotique très actif, il est utilisé en cas d'échec du traitement précédent. Posologie: dose de 0.5 mg / kg / jour, ou 1 mg / kg / 2 jours. Cet antibiotique est très prometteur compte tenu de son mode d'action. En effet, il se fixe sur les stérols de la membrane cytoplasmique, et il provoque la formation de pores. A travers ces pores membranaires, le parasite perd des ions nécessaires à sa survie. L'Amphotéricine B se fixe préférentiellement à l'ergostérol qui constitue le stérol majeur de la membrane plasmique des *Leishmania* et des champignons unicellulaires, mais pas sur celle des cellules de mammifères. La toxicité pour l'homme est due à une affinité pour le cholestérol membranaire.

1.8.4. Allopurinol

Les *Leishmania* ainsi que les autres hémoflagellés sont incapables de synthétiser les bases puriques de novo et donc nécessitent des purines exogènes. L'allopurinol est un analogue d'hypoxantine, il est hydrolysé en allopurinol ribose analogue à l'inosine. Ce nucléoside est incorporé à la place de l'ATP dans les acides ribonucléiques des *Leishmania* où il interfère dans la synthèse des protéines et tue le parasite.

Il est efficace chez l'animal dans les leishmanioses expérimentales. Quelques patients ont été traités en association avec les antimoniés lors d'échecs de ceux-ci utilisés seuls.

1.8.5. L'immunothérapie

Elle est souvent utilisée en association avec la chimiothérapie. En effet, il a été démontré que l'immunothérapie permet d'obtenir de meilleurs résultats tout en diminuant les doses des médicaments souvent toxiques pour le patient.

Les injections (2 à 3 fois par mois) de **BCG** additionné de promastigotes tués, se sont avérées aussi efficaces que le traitement quotidien par l'antimonié.

Au Brésil, le traitement par l'association **d'interféron- γ** et d'antimonié, a été toléré par les patients atteints d'une LV. De plus, 8 patients sur 9 ont été complètement guéris en recevant une injection quotidienne de 100 μg d'IFN- γ par m^2 de surface du corps, avec 20 mg / kg / j d'antimonié.

2. BIOLOGIE CELLULAIRE DES *LEISHMANIA*

2.1. Ultrastructure et organites spécifiques des *Kinétoplastida*

2.1.1. Membrane, microtubules et cytosquelette

Le parasite est limité par une membrane unitaire typique, doublée du côté interne par une couche de microtubules d'environ 20 nm de diamètre à fonction présumée de cytosquelette. En effet, ces microtubules de structure très stable servent à maintenir la forme du parasite et renforcent la membrane cytoplasmique, excepté autour de la poche flagellaire. Après une fission binaire, les cellules filles héritent de nouveaux microtubules qui s'intercalent entre les parentaux (Sherwin et Gull., 1989).

2.1.2. Le kinétoplaste

Le kinétoplaste est un organite typique des flagellés kinétoplastidés, il est situé à la base du flagelle, à une faible distance du corpuscule basal d'où démarre le flagelle. Le kinétoplaste constitue l'unique mitochondrie des kinétoplastidés, c'est un corpuscule à

double paroi contenant l'ADN kinétoplastique sous la forme de deux classes moléculaires, les maxi-cercles et les mini-cercles (Stuart et Feagin, 1992).

2.1.3. La poche flagellaire et le flagelle

La poche flagellaire des leishmanies (ou des trypanosomatidés en général) est une région hautement différenciée de la membrane de ces organismes. En effet, elle constitue le seul site où s'effectuent l'endocytose et l'exocytose des macromolécules, et l'insertion de nouvelles molécules membranaires chez ces organismes sans qu'ils soient exposés aux défenses de l'hôte telles que le système lysosomal dans le cas des *Leishmania*. La membrane plasmique recouvre également le flagelle en passant par la poche flagellaire sans interruption. A l'ouverture de la poche, on note un épaississement du flagelle et l'existence de jonctions de type hémidesmosomes entre le flagelle et la région opposée du corps cellulaire. On considère que cette jonction limite l'accès des substances à la poche flagellaire et sert aussi de point d'ancrage pour le flagelle au corps cellulaire (revue par Webster et Russell., 1993). Le corpuscule basal situé à la base du flagelle a une structure centriolaire classique. Le flagelle présente une organisation classique avec 9 paires de microtubules périphériques et une paire centrale.

2.1.4. Les glycosomes

Les glycosomes sont des organites spécifiques des kinétoplastidés, ils ressemblent aux péroxisomes des eucaryotes supérieurs. Les glycosomes sont le siège de plusieurs voies métaboliques, telles que la glycolyse, le métabolisme du glycérol, la biosynthèse des lipides, des pyrimidines et la fixation du dioxyde de carbone. Les glycosomes sont considérés comme des réservoirs d'enzymes parasitaires, et comme des cibles potentielles pour la chimiothérapie (Hart et Oppendoes., 1984). Par ailleurs, le stade amastigote de *L. m. mexicana* présente d'autres vésicules cytoplasmiques, très larges, caractéristiques de l'espèce, ressemblant aux lysosomes des eucaryotes supérieurs. Ces vésicules ont été appelées "mégasomes". Les mégasomes contiennent une batterie d'enzymes nécessaires à

la survie de *L. m. mexicana* dans la vacuole parasitophore. La plus importante de ces enzymes est la cystéine protéinase (Pupkis et coll., 1986).

2.2. Relations hôte-parasite

2.2.1. Développement des leishmanies chez le vecteur et leur transmission

Une fois arrivés dans l'intestin moyen du vecteur, les amastigotes vont progressivement se transformer en fins et longs nectomonades. Cet événement a lieu à l'intérieur de la membrane péritrophique qui est constituée d'un treillage chitineux lui-même entouré par une matrice d'hydrates de carbone et de protéines. Cette matrice est sécrétée par les cellules intestinales autour du repas sanguin. La paroi antérieure de la membrane se désintègre sous l'action d'enzymes parasitaires de type chitinolytique et les nectomonades migrent vers l'intestin moyen antérieur ou thoracique où ils continueront à se diviser tout en étant fixés au microvillis de l'intestin. Aux abords de la valve cardiaque, ils se transforment en larges haptomonades qui envahissent l'oesophage et le pharynx du phlébotome et se transforment en paramastigotes, plus compactes, possédant un court flagelle leur permettant de se fixer à la cuticule proventriculaire par la formation de plaques d'hémidesmosomes (Schlein., 1993). La fixation du flagelle des formes non infectieuses à la paroi de l'intestin est attribuée aux LPG qui couvrent tout le parasite. Ces LPG subiront des modifications structurales et les paramastigotes se détacheront de la paroi et deviennent infectieux (formes métacycliques). Les promastigotes métacycliques sont considérés comme aptes à vivre chez l'hôte vertébré (Sacks., 1989). La transmission à l'hôte vertébré se fait lors d'un repas sanguin. Les promastigotes sont émis en sens contraire du sang pompé, à travers le canal alimentaire. Cette régurgitation de parasites est due à une altération de la valve cardiaque du vecteur par l'équipement enzymatique des promastigotes (Schlein., 1992).

2.2.2. La métacyclogénèse des promastigotes des leishmanies

Les promastigotes métacycliques infectieux se distinguent des autres formes par quelques caractéristiques morphologiques et physiologiques. Ils sont très mobiles, le corps cellulaire est de petite taille, ils n'adhèrent pas aux tissus du vecteur, et ils possèdent un long flagelle qui fait le double du corps cellulaire. La poche flagellaire est relativement profonde (Killick-Kendrick., 1986). De plus, les métacycliques ne se divisent pas *in vitro*, mais peuvent se transformer au bout de 24 à 48 h en promastigotes capables de se multiplier (Mallinson et Coombs., 1989). D'un point de vue biochimique, la métacyclogénèse a été expliquée en partie grâce aux études faites sur des parasites cultivés en milieu axénique. En effet, une différence entre la surface de la membrane des formes infectieuses et celles qui ne le sont pas a été montrée. Les glycoconjugués des formes en phase logarithmique sont différents de ceux des métacycliques en phase stationnaire qui ressemblent à ceux des amastigotes intracellulaires (Sacks et coll., 1985). Sacks et Da Silva., (1987) ont montré que les formes métacycliques de *L. major* ne peuvent plus être agglutinées par la PNA (lectine d'arachide). Puis, Pimenta et coll., (1989) ont montré que la transformation des promastigotes de la phase logarithmique en métacycliques coïncide avec l'acquisition de nouveaux hydrates de carbone par le lipophosphoglycane (LPG). LPG est une molécule majeure de la surface, impliquée dans l'attachement des *Leishmania* aux macrophages. Leur études sur le glycocalyx de *L. major* par microscopie électronique ont montré que celui des métacycliques était plus épais (17 nm d'épaisseur) par rapport à celui des promastigotes en phase exponentielle (7 nm d'épaisseur).

La métacyclogénèse a été aussi abordée d'un point de vue régulation de l'expression des gènes. En effet, comme pour les gènes "tissu-spécifiques" des métazoaires, il a été démontré que certains gènes des *Leishmania* s'expriment plus dans un stade parasitaire que dans un autre, et parfois ils sont nettement silencieux. Plusieurs travaux sur les *Leishmania* ont permis de caractériser des gènes qui s'expriment préférentiellement chez les promastigotes métacycliques. Seale et coll., (1989) ont cloné trois gènes de *L. major*

apparentés aux *HSP 70*. Le messager d'un de ces gènes est détecté uniquement dans l'ARN des métacycliques.

En 1990, Coulson et Smith ont isolé quatre clones ADNc dont les gènes correspondants (A, B, C et D) s'expriment plus chez les métacycliques et parfois uniquement chez ces derniers. Des anticorps spécifiques du produit codé par le gène B reconnaissent une protéine de surface sur les promastigotes métacycliques et les amastigotes, par contre aucune réactivité de ces anticorps n'a été observée sur les formes procycliques non infectieuses (Flinn et Smith., 1994). Dans une autre étude faite sur *L. major* (Brodin et coll., 1992), un autre gène a été caractérisé. Ce gène code pour une protéine, dont les transcrits ont été appelés MAT-1 (metacyclics promastigotes associated transcrits). Cette protéine possède un domaine de fixation à l'ADN de type leucine zipper comparable à celui des facteurs de transcription. Les fonctions exactes de ces gènes spécifiques des promastigotes métacycliques restent encore à déterminer. Néanmoins, ces gènes constituent un bon outil de travail pour les biologistes moléculaires afin d'élucider les mécanismes de la régulation de l'expression des gènes chez les *Leishmania*, et peut-être de ceux qui gèrent la différenciation de ces organismes.

2.2.3. Interaction des leishmanies avec les macrophages

La caractéristique la plus importante des *Leishmania* est leur capacité à parasiter le phagolysosome des macrophages où elles vont non seulement survivre, mais se différencier et se multiplier. L'adaptation de ces parasites à un environnement aussi hostile est facilitée par plusieurs mécanismes tels que la résistance à la lyse par le complément, la tolérance d'un pH acide et d'une température élevée, et enfin, la modification des molécules de leur surface (Chang et Chaudhuri., 1990). En réalité, ces "stress" induisent une modification de l'expression des gènes parasitaires (Zilberstein et Shapira., 1994).

L'étape primordiale d'un parasitisme intracellulaire est l'adhérence aux cellules cibles. Dans le cas des *Leishmania*, la pénétration dans les macrophages se fait par endocytose via les récepteurs des macrophages (revue par Ouaisi., 1988; Russel et

Talamas-Rohana; 1989; Chang et Chaudhuri., 1990; Alexander., 1992). Parmi ces récepteurs on distingue: les récepteurs du complément (CR1/CR3) (Mosser et Edelson., 1984), le récepteur mannose-fucose (MFR) (Wilson et Pearson., 1986), le récepteur de la fibronectine (FnR) (Rizvi et coll., 1988) et le récepteur AGE (Advanced glycosylation end products) (Mosser et coll., 1987).

2.2.3.1. Les récepteurs (CR1/CR3)

Plusieurs évidences ont été rapportées sur l'incapacité des composants du complément à lyser les promastigotes infectieux. De surcroît, ces facteurs aident les *Leishmania* à pénétrer dans les macrophages (Mosser et Edelson., 1984; Mosser et coll., 1985). D'autre part, les leishmanies peuvent également modifier leur surface afin de mieux servir le complément (Puentes et coll., 1990), et se fixer sur le CR1. Sachant que l'endocytose via le CR1 induit de faibles "explosions respiratoires", les parasites intracellulaires auront plus de chances de survivre (Da Silva et coll., 1989; Ouaisi., 1988). Les formes non infectieuses peuvent utiliser le CR3 pour pénétrer dans les macrophages (Da Silva et coll., 1989), mais cela provoque de puissantes "explosions respiratoires", souvent fatales pour les parasites.

2.2.3.2. Les récepteurs de la fibronectine, mannose-fucose et AGE

Leur rôle dans l'adhérence des promastigotes aux macrophages a été démontré *in vitro*. En effet, les macrophages synthétisent et excrètent la fibronectine qui peut opsoniser les promastigotes et favoriser leur attachement aux phagocytes (Ouaisi., 1988). Cependant, on pense que le FnR joue un rôle moindre dans l'adhérence car il n'est pas spécifique aux macrophages et induit "l'explosion oxydative".

2.2.3.3. Rôle des molécules de surface des leishmanies

Les CR1/CR2 et FnR appartiennent tous les deux à la grande famille des intégrines et reconnaissent des peptides portant une séquence commune RGD. Les travaux de deux

équipes indiquent clairement que les *Leishmania* possèdent une molécule de surface qui contient une séquence RGD, et qui est impliquée dans la fixation à ces deux types de récepteurs (Rizvi et coll., 1988; Russel et Wright., 1988). Dans la première étude, il a été démontré que le traitement préalable des promastigotes par des F(ab)'2 d'IgG anti-Fn ou la saturation des récepteurs Fn des macrophages par du RGDS, inhibe l'infection des cellules par les parasites. De plus, l'anticorps reconnaît une protéine de surface de *Leishmania* (la gp63). Les auteurs ont suggéré une structure "Fibronectine-like" pour la gp63 et un rôle pour cette protéine dans l'adhérence via le FnR par le biais d'un motif RGDS (Ouaissi., 1988; Rizvi et coll., 1988). La seconde étude a montré qu'un peptide de 21 résidus d'acides aminés contenant un motif RGD, déduit de la séquence de la gp63, peut rentrer en compétition avec les promastigotes et inhiber leur adhérence aux macrophages (Russel et Wright., 1988). Le même résultat a été obtenu en utilisant un antisérum dirigé contre ce peptide. De plus, ces anticorps reconnaissent le C3 (Russel et coll., 1989). Dans la même période, un problème s'est posé sur l'existence de la séquence RGD dans la gp63 (Miller et coll., 1990). Il s'est avéré que la séquence de la gp63 publiée par Buton et McMaster., (1988) contient une erreur de cadre de lecture. Ce n'est que dans une étude ultérieure que Soteriadou et coll., (1992) ont clairement montré que la séquence Ser-Arg-Tyr-Asp de la gp63 mime immunologiquement et fonctionnellement la séquence RGD de la fibronectine, ce qui conforte pleinement les observations qui ont été rapportées au sujet de la communauté de structure et de fonction entre la Fn et la gp63 (Ouaissi., 1988; Rizvi et coll., 1988).

En ce qui concerne le rôle du lipophosphoglycane (LPG) dans l'adhérence des parasites aux macrophages, il a été démontré qu'il se fixe en présence de sérum sur un site conféré par la chaîne α du CR3 et de la p150,95 (Talamas-Rohana et coll., 1990), deux membres de la famille des intégrines de la classe CD18. De plus, le site de fixation du LPG sur le CR3 est distinct de celui du C3bi.

En conclusion, les molécules gp63 et le LPG sont présentes à la fois chez le promastigote et l'amastigote, elles jouent un rôle effectif dans l'adhérence des leishmanies

aux macrophages et sont considérées comme des facteurs de virulence pour ces parasites. Les contributions relatives de ces molécules dans l'attachement des leishmanies aux phagocytes restent encore à déterminer.

3. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DES LEISHMANIES

3.1 Le génome des leishmanies

Le génome des leishmanies est de petite taille, il a été estimé à 50 000 kb (Léon et coll., 1978; Landfear et coll., 1983). Les données actuelles indiquent que les leishmanies sont diploïdes pour la plupart des loci (Iovannisci et coll., 1984; Iovannisci et Beverley, 1989; Cruz et Beverley., 1990). Mais, compte-tenu de la plasticité du génome de ces organismes, qui va de l'amplification et/ou délétion de certains gènes (Pages et coll., 1989) aux polymorphismes de taille observés pour certains chromosomes (Bastien et coll., 1990; Cruz et coll., 1993), la ploïdie des leishmanies reste difficile à établir avec certitude. On pense que certains chromosomes sont diploïdes et d'autres haploïdes.

Les chromosomes des leishmanies, comme ceux des *Kinetoplastida*, ne se condensent à aucune phase du cycle mitotique (Vickerman et Preston., 1970). Ce phénomène implique l'impossibilité de caryotypage par les techniques de base. Pour contourner cette difficulté, plusieurs équipes ont utilisé la technique d'électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Cette technique a permis de montrer que les *Leishmania* contiennent 25 à 30 petits chromosomes (selon les souches et les espèces), dont la taille varie de 200 à 2000 kb (Giannini et coll., 1986; Samara et coll., 1987; Pages et coll., 1989). Les chromosomes des *Leishmania* possèdent des télomères. Au niveau de ces télomères, on retrouve 6×10^5 copies d'une séquence d'ADN hexamérique répétée en tandem, (CCCTAA)_n. Ces régions télomériques comportent un seul site de coupure pour l'enzyme de restriction Bal 31 (Van Der Ploeg., 1984b), d'où la difficulté de leur clonage par les techniques habituelles. Jusqu'à présent, aucune séquence génétique des centromères des *Kinetoplastida* et de *Plasmodium* n'a été identifiée.

3.2. L'ADN kinétoplastique

L'ADN kinétoplastique (ADNk) constitue l'ADN mitochondrial des *Trypanosomatidae*. C'est un réseau complexe de deux types d'ADN circulaires enchaînés les uns aux autres, environ 20 à 50 maxi-cercles et 5000 à 10 000 mini-cercles. Les maxi-cercles font 20 à 39-kb suivant les espèces et ils sont identiques au sein d'un même réseau. La taille des mini-cercles fait 0.5 à 2.5-kb, leur séquence peut varier au sein d'une même cellule, mais ils possèdent tous une région fortement conservée qui représente les 10% de la taille relative (Simpson., 1987; Ryan., 1988., Stuart., 1991).

3.2.1. Les maxi-cercles

Les maxi-cercles sont activement transcrits. Le séquençage du maxi-cercle de *L. tarentolae* a permis d'identifier deux régions. La première région conservée chez tous les *Trypanosomatidae*, fait 17-kb et code essentiellement pour les gènes mitochondriaux. La deuxième région de 14-kb est variable, constituée de séquences riches en A+T, et code pour un ARN guide (ARNg). Les gènes mitochondriaux les plus transcrits sont ceux des ARN ribosomiaux 9S et 12S. Ce sont les plus petits ARNr rencontrés dans la nature. Les autres gènes sont ceux des différentes sous-unités I, II, et III de la "cytochrome oxydase" (co), les gènes du complexe NADH déshydrogénase (1, 4, et 5), le gène de l'apocytochrome b (cyb), et les gènes MURF1 et 2 (Maxi-cercles Unidentified Reading Frame). D'autres cadres ouverts ont été identifiés, mais aucun messenger correspondant n'a été détecté, et aucune protéine ne leur a été attribuée (Simpson., 1987).

3.2.2. Les mini-cercles

Les mini-cercles codent pour les ARNg impliqués dans l'édition de l'ARNm des gènes mitochondriaux. Les mini-cercles des individus d'une même espèce possèdent une séquence commune de 120-pb. Par ailleurs, une séquence de 12-pb a été retrouvée chez tous les kinétoplastidés, elle constitue probablement une origine de réplication (Simpson., 1987). L'organisation des séquences des mini-cercles varie d'une espèce à l'autre. En

effet, le mini-cercle de *T. brucei* code pour trois ARNg différents, alors que celui de *L. tarentolae* ne code que pour un seul ARNg à la fois (Stuart., 1991).

3.3. L'édition de l'ARN

L'édition de l'ARN est un mécanisme biochimique qui modifie le message génétique pour le rendre compréhensible. Cette modification se fait par addition et/ou délétion d'un ou de plusieurs nucléotides d'uridine pour le cas des *Trypanosomatidae*. Ce phénomène a bousculé la règle de la colinéarité des gènes et des protéines. Bien qu'il fût découvert la première fois chez le protozoaire parasite *T. brucei*, l'édition de l'ARN s'est révélé un peu plus répandu chez d'autres organismes uni- et pluricellulaires. On retrouve l'édition chez les paramyxovirus (virus des oreillons et de la rougeole) par addition de deux G, les plantes telles que le blé où un C remplace un U dans l'ARN mitochondrial, le champignon *Physarum polycephalum* par insertion de C, et enfin chez les mammifères pour l'ARNm de l'apolipoprotéine B où un C est substitué par un U (Benne et Van der Spek., 1992).

L'exemple le plus impressionnant de l'édition d'ARN est celui qui a lieu sur l'ARNm du gène coIII (cytochrome oxydase III) de *T. brucei* (Feagin et coll., 1988). En effet, les auteurs ont isolé un ADNc partiel de 626 pb, en utilisant comme sonde un oligonucléotide correspondant à la séquence 3' de l'ARNm de coIII de *Leishmania* et de *Crithidia*. En hybridation sur Southern-blot, cet ADNc ne reconnaît aucun gène de *T. brucei*. En poussant les analyses des séquences, les auteurs se sont rendus compte que sur les 626 nt de la séquence partielle, 347 uridines n'étaient pas codées par le gène. Ces uridines supplémentaires ont été rajoutées au niveau de 121 sites différents. L'une de ces additions engendre un codon stop ayant la même position que celui des ARNm équivalents de *Leishmania* et *Crithidia*. De plus, 16 uridines ont été déléetées de sept sites.

3.3.1. L'ARN guide

Blum et coll., (1990) ont étudié systématiquement les séquences nucléotidiques de l'ADNk. Ils se sont rendu compte qu'il existe dans l'ADN maxi-cercle de *L. tarentolae* des

séquences complémentaires aux séquences d'ARN édité. Ces régions complémentaires sont très petites, de 14 à 55 nt, et comportent des appariements exotiques tels que G:U à coté des appariements traditionnels G:C et A:U. Ils ont aussi démontré que ces régions sont transcrites en petits ARN d'environ 70 nt qu'ils ont appelé ARN guide (ARNg). Ces ARNg transmettent l'information nécessaire à l'édition des ARN mitochondriaux.

Par ailleurs, une culture axénique prolongée et des repiquages fréquents de promastigotes de *L. tarentolae* provoquent la perte de 32 ARNg codés par les mini-cercles. Ces ARNg servent dans l'édition des ARNm du complexe I G1-G5 de la chaîne respiratoire (G1=ND8, G2=ND9 et G5=ND3: ND=NADH déshydrogénase) (Thiemann et coll., 1994). Ceci implique que le promastigote n'a pas besoin d'un complexe I fonctionnel pour survivre chez l'insecte vecteur.

3.3.2. Le mécanisme de l'édition

On assiste tout d'abord à un appariement entre l'ARNg et l'ARNm à éditer, cet appariement se fait grâce à de petites séquences d'ancrage. Cet ancrage définirait le site d'édition. Quant au mécanisme de l'édition lui même, deux modèles possibles ont été proposés. Dans le premier modèle, on pense que la coupure, l'addition et/ou délétion de U, puis la ligation de l'ARN sont réalisées par des enzymes et que c'est l'UTP cellulaire libre qui fournit les résidus d'uridine (Benne., 1989; Blum et coll., 1990; Harris et coll., 1992). En effet, une activité 3' uridyltransférase a été détectée dans les mitochondries, sans qu'elle soit formellement associée à l'édition (Bakalara et coll., 1989). Le deuxième modèle suggère que l'addition et/ou délétion d'uridines se fait par deux réactions successives de transestérification (Cech., 1990; Blum et Simpson., 1992) catalysées par un complexe protéique analogue au spliceosome du trans-épissage. Le complexe contiendrait des molécules catalytiques et d'autres protéines qui joueraient un rôle dans la stabilisation des ARN et leur translocation. Dans ce modèle, la source d'uridine serait la queue poly-U que la plupart des ARNg semblent posséder.

L'existence de gène où il manque les signaux de début et de fin de transcription, et du processus d'édition, permet théoriquement la fabrication de plusieurs protéines à partir d'un seul gène. Ceci constitue un niveau supplémentaire de la régulation de la transcription des gènes mitochondriaux, en contrôlant l'abondance de certains ARNm. En effet, l'édition d'ARN est régulé différenciellement selon le stade de développement parasitaire chez *T. brucei*. Il s'agit des gènes *coII* et *cyb* qui sont plus transcrits chez les formes procycliques de l'insecte vecteur que chez les formes sanguicoles trapues et pas du tout chez les formes sanguicoles effilées (Feagen and Stuart., 1988)

D'autres auteurs ont avancé que l'édition serait un mécanisme primitif utilisé par certains organismes dans la modification et la réparation des séquences d'ARN, avant que les polymérases n'apparaissent dans la nature.

3.4. Les éléments de séquences régulatrices en *cis* de l'expression des gènes des *Trypanosomatidae*

La majorité des gènes des *Trypanosomatidae* sont arrangés en tandem et transcrits en ARN polycistronique. Les ARNm matures seront obtenus après deux événements post-transcriptionnels qui sont le trans-épissage en 5' et la polyadénylation en 3' (Boothroyd., 1985; Borst., 1986). En effet, presque tous les ARNm nucléaires possèdent en 5' un exon commun acquis par trans-épissage. Cet exon a été appelé mini-exon ou "spliced-leader", il est composé de 39 nucléotides (nt) et dérive d'un transcrit primaire (mini-exon derived RNA, ou medRNA de 95 nt) conservé chez toutes les *Leishmania* (Perry and Agabian., 1991).

Les sites d'initiation de la transcription et les promoteurs de la plupart des gènes ubiquitaires, n'ont pas été caractérisés. On pense qu'ils sont situés à plusieurs kb en amont des gènes qu'ils contrôlent (Pays., 1993). Actuellement, on connaît six éléments de séquences jouant en *cis* un rôle de promoteur chez les *Trypanosomatidae*. Quatre éléments distincts chez *T. brucei*, le promoteur *parp* ("procyclic acidic repetitive protein") (Sherman et coll., 1991), le promoteur VSG (the variants surface glycoproteins)

(Zomerdijk et coll., 1990), le promoteur du gène de l'actine et enfin celui de U2 snRNA. Les gènes PARP et VSG sont transcrits par l'ARN polymérase I et II. Le cinquième promoteur a été caractérisé en même temps chez *L. tarentolae* (Saito et coll., 1994) et chez *L. m. amazonensis* (Agami et coll., 1994). Ces éléments sont en amont des gènes codant pour le mini-exon, et conservés chez quatorze autres espèces de *Leishmania*. Les gènes codant pour le mini-exon sont transcrits par l'ARN polymérase II et III. Enfin, le sixième promoteur potentiel a été décrit chez *L. enriettii*, c'est un élément de séquence du locus *Lemdr1* (*L. enrietti* multidrug resistance gene). Cet élément contrôle négativement le taux d'ARNm du gène rapporteur *néo*, lorsqu'il est placé dans un vecteur d'expression pALTneo (Wong et coll., 1994).

Actuellement, il est clairement admis que les régions intergéniques (RI) jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes chez les *Trypanosomatidae* (Graham., 1995). Ce nouveau mode de régulation intervient au niveau de la conversion des ARN polycistoniques en ARNm matures. En effet, les RI sont le siège de la polyadénylation de l'ARNm en 3' et du trans-épissage et l'addition du spliced-leader sur l'ARNm en 5'. Plusieurs travaux récents indiquent que ces deux processus sont couplés (Aly et coll., 1994; Berberof et coll., 1995; LeBowitz et coll., 1993., Vassella et coll., 1994; Matthews et coll., 1994). La séquence consensus impliquée dans ces processus est riche en pyrimidine, elle contient le dinucléotide AG qui détermine le site accepteur du trans-épissage. Ce ci a été démontré par Flinn et Smith., 1992, pour le locus *Lm 16*, de Lafaille et coll., 1992, pour la RI des gènes de l' α -tubuline 40 et LeBowitz et coll., 1993, pour la RI du locus *DHFR-TS* de *L. major*.

En conclusion, tous ces travaux ont mis en évidence un nouveau mécanisme post-transcriptionnel de régulation génique, du fait que le site de trans-épissage en aval spécifie le site de polyadénylation du transcrit en amont. Ces sites intergéniques non traduits contrôlent l'expression des gènes qu'ils flanquent en jouant sur la stabilité des ARNm correspondants. Le mécanisme exact de ce type de régulation n'a pas encore été déterminé, il se pourrait qu'il implique des protéines régulatrices non identifiées à ce jour, qui agiraient

au niveau des séquences riches en pyrimidine localisées dans les RI non traduites, les UTRs ("untranslated regions"). Ces UTRs sont bifonctionnelles et impliquées dans la maturation des ARNm des *Trypanosomatidae*.

4. GENERALITES SUR LA REPRODUCTION SEXUEE

4.1. Définition de la reproduction sexuée

On qualifie de sexuels les phénomènes naturels impliquant la formation d'un nouvel individu dont les gènes dérivent de plus d'un parent (Margulis et coll., 1985). La reproduction sexuée implique une alternance entre phase haploïde et phase diploïde. La méiose fait passer les cellules à l'état haploïde, et la fécondation ou la conjugaison restaure la diploïdie. Chez les protistes, eucaryotes unicellulaires, il existe deux modes de propagation, la reproduction sexuée et la multiplication végétative. Cette dernière ne comporte que des mitoses, comme c'est le cas pour les euglènes et les amibes qui sont haploïdes, et ne subissent jamais la méiose (Raikov. I.V., 1982).

4.2. Origine de la diploïdie

Plusieurs mécanismes sont à l'origine de la diploïdie: 1) l'endomitose où la cellule réplique ses chromosomes sans caryocinèse. Ce processus a été observé chez certains protistes (flagellés, radiolaires et ciliés) (Raikov, 1982; Grell, 1973). Le deuxième mécanisme a été décrit chez certains héliozoaires actuels et fait intervenir deux cellules haploïdes où l'une ingère l'autre sans la destruction du noyau de la proie (Margulis et coll., 1985; Shigenada et coll., 1973). Le résultat est une cellule binucléée ou plurinucléée appelée hétérocaryon, qui par simple cytocinèse peut retrouver son état haploïde ou uninucléé. Selon les conditions du milieu, il s'instaure une alternance entre états uninucléés et plurinucléés. Si les conditions sont favorables, l'état uninucléé est privilégié car il est mieux adapté à une multiplication rapide. Dans le cas contraire, c'est l'état plurinucléé qui est favorisé. L'hétérocaryon obtenu contenant ainsi des noyaux de génotypes différents va

bénéficier de complémentations efficaces. De plus, la fusion cytoplasmique permet à l'hétérocaryon d'avoir un rapport surface/volume plus avantageux, d'où une meilleure résistance notamment à la dessiccation (Herman et Collenot, 1993). Enfin, un dernier mécanisme où les noyaux coexistant dans l'hétérocaryon fusionnent, ce qui permet d'avoir une variation de ploïdie qui est sous le contrôle du milieu. Il a été démontré que chez divers protistes, certains champignons et algues, la privation de nourriture déclenche la reproduction sexuée, après une période de multiplication végétative (Goodnough, 1985).

4.3. Origine de la méiose

La méiose dérive de la mitose (Goodnough, 1985). Les deux processus utilisent le même appareil cytosquelettique. Un grand nombre de gènes impliqués dans la mitose interviennent aussi dans la méiose (Denis et Lacroix, 1992; Simchen et Hugerat, 1993). La méiose est nécessaire pour rétablir l'haploïdie, elle fait le tri entre deux assortiments de chromosomes afin que les cellules filles aient une garniture chromosomique équilibrée, mais elle ne peut pas répartir les chromosomes en plus de deux lots. De plus, au cours de la méiose, des recombinaisons génétiques ont lieu, engendrant de nouvelles combinaisons d'allèles sur chaque chromosome.

4.4. La différenciation sexuelle

Les protistes peuvent établir la phase diploïde par deux moyens différents, soit par conjugaison, soit par syngamie. La syngamie est considérée comme l'événement responsable de la diploïdie et a été utilisée par les protistes archaïques. Elle permet l'union de cellules identiques et donne un zygote qui a les mêmes caractéristiques que les gamètes. Par conséquent, ce dernier ne pourra pas empêcher d'autres cellules de s'unir à lui entraînant l'incapacité de produire des gamètes ultérieurement, sachant que la méiose distribue les chromosomes seulement en deux assortiments. Les protistes ont résolu ce problème en utilisant la différenciation sexuelle. La production de gamètes de phénotypes distincts qui une fois unies en zygote, rend impossible toute nouvelle fusion (Grell,

1973). On distingue deux systèmes de différenciation sexuelle, le système dioïque et le système monoïque.

Les protistes dioïques possèdent deux types sexuels et produisent des gamètes de deux génotypes (+ ou -). Cette diversification cellulaire en deux types est sous le contrôle d'un gène appelé déterminateur (d) qui existe sous deux formes alléliques (+ ou -).

Les cellules végétatives des protistes monoïques ont toutes le même génotype et donnent des gamètes de phénotypes (+) ou (-). Dans ce cas, il s'agit de différenciation puisqu'une même information génétique est utilisée de deux manières. On peut imaginer qu'un gène déterminateur (d) produit par épissage optionnel deux protéines distinctes, capables d'engager les cellules dans l'une ou l'autre voie de différenciation. Chez la drosophile, un tel phénomène intervient dans l'exécution du programme de différenciation mâle ou femelle par les cellules somatiques (Dargouge, O., 1989).

Donc, dans un système dioïque, pour produire des cellules diploïdes de deux phénotypes distincts, il suffit que le gène déterminateur existe sous deux formes: dominant/récessif, actif/inactif, ou présent/absent. Quant au système monoïque, il opère de la même façon, selon la présence d'une ou deux copies du gène déterminateur dans les cellules.

5. LA COMMUTATION DU TYPE SEXUEL CHEZ LA LEVURE

Les cellules bourgeonnantes de *Saccharomyces cerevisiae* peuvent être haploïdes ou diploïdes. Les diploïdes sont hétérozygotes à un locus appelé locus du type conjuguant (*MAT*, pour mating-type). Il existe sous deux allèles codominants (Arima et Takano, 1979), appelés *MAT* a et *MAT* α . Ces derniers gouvernent l'expression de plusieurs gènes spécifiques de la commutation sexuelle. Les cellules haploïdes sont soit *MAT* a, soit *MAT* α . Selon l'origine de la souche, hétérothallique (ho) ou homothallique (HO), le type conjuguant est respectivement, stable ou non. En effet, les cellules haploïdes (HO) peuvent changer leur type sexuel fréquemment, ce qui permet à une cellule haploïde de produire une autre cellule de type sexuel opposé pour conjuguer et former un diploïde *MAT* a/*MAT*

α . L'expression simultanée des gènes *MAT a* et *MAT α* chez la cellule diploïde induit l'incapacité de conjuguer, mais lors d'une carence en azote et épuisement des sources de carbone (ce qui entraîne une diminution d'AMP cyclique), cette dernière peut subir une méiose, sporuler et donner quatre cellules haploïdes, deux du type sexuel a et deux du type α . En réalité, *Saccharomyces cerevisiae* possède deux autres copies des gènes contrôlant la commutation du type conjuguant. Ces gènes se trouvent aux loci *HML α* et *HMR a* qui, respectivement, sont localisés sur les bras gauche et droit du chromosome III (Harashima et Oshima, 1976), le locus *MAT* occupe une position intermédiaire. Les loci *HML α* et *HMR a* sont en permanence réprimés et c'est la transposition de l'une ou l'autre cassette au locus *MAT* qui lui permet d'être activé, décidant ainsi du type sexuel de la cellule haploïde (Hicks et coll, 1977).

5.1. Structure et organisation des loci *HML α* , *HMR a*, *MAT α* et *MAT a*

Le clonage de la cassette *HML α* (Hicks et coll., 1979) a permis l'isolement des autres loci en utilisant cette première comme sonde pour cribler une banque génomique de *Saccharomyces cerevisiae*, sachant que ces loci ont des séquences en partie homologues (Hicks et coll., 1977). Les auteurs (Strathern et coll., 1980), en utilisant la microscopie électronique pour analyser les hétéroduplexes formés par les différents loci deux à deux, et la digestion par la nucléase S1 des fragments simples brins, sont arrivés aux résultats suivants: *HML*, *HMR*, et *MAT* ont une même structure de base sur deux régions homologues (X et Z). Ces deux régions sont de part et d'autre d'une région de 750-pb ($Y\alpha$) unique au gène α ou de 600-pb (Ya) unique au gène a. *HML* et *MAT* possèdent une quatrième séquence (W) homologue non trouvée dans *HMR* dans aucune des souches étudiées. D'autre part, les loci *HML*, *HMR*, et *MAT* sont alignés avec une même polarité. Enfin, les structures visualisées au microscope électronique sont alignées sur le chromosome III dans l'ordre WXYZ de la gauche vers la droite (Fig. 3).

5.2. Le contrôle physiologique et génétique de la commutation

La fréquence et le profil de la commutation homothallique sont surtout contrôlés par le niveau d'expression du gène de l'endonuclease *HO*. *HO* s'exprime seulement dans les cellules haploïdes durant la phase G1 du cycle cellulaire et seulement chez la cellule mère. Donc, la commutation de signe est héritée de façon asymétrique (Nasmyth, H.A., 1983). Une analyse génétique a montré que la transcription du gène *HO* est sous le contrôle de protéines régulatrices (*SWI1-6*) et (*SIN*) qui jouent des rôles essentiels dans d'autres aspects de la physiologie cellulaire, comme des facteurs de transcription ou autres protéines qui se fixent sur l'ADN (Peterson et Herskowitz, 1992).

5.3. Le mécanisme moléculaire de la commutation du locus *MAT*

5.3.1. La coupure de *MAT* par l'endonuclease *HO*

L'endonuclease *HO* provoque en un site bien précis de *MAT* une coupure bicaténaire de l'ADN. Cette coupure est impossible au niveau des loci silencieux. La purification de *HO* a permis l'identification de la séquence reconnue par l'enzyme (Nickoloff et coll., 1986). Cette séquence asymétrique couvre au moins 12-pb de la séquence *Yα* ou *Ya* et 12-pb de *Z1*.

5.3.2. La digestion des extrémités par une exonuclease 5'→3'

Une longue extrémité 3' simple brin est produite dans la région *Z* (au niveau d'une séquence unique distale du locus *MAT*) par une exonuclease lente (1 à 2 nt par seconde).

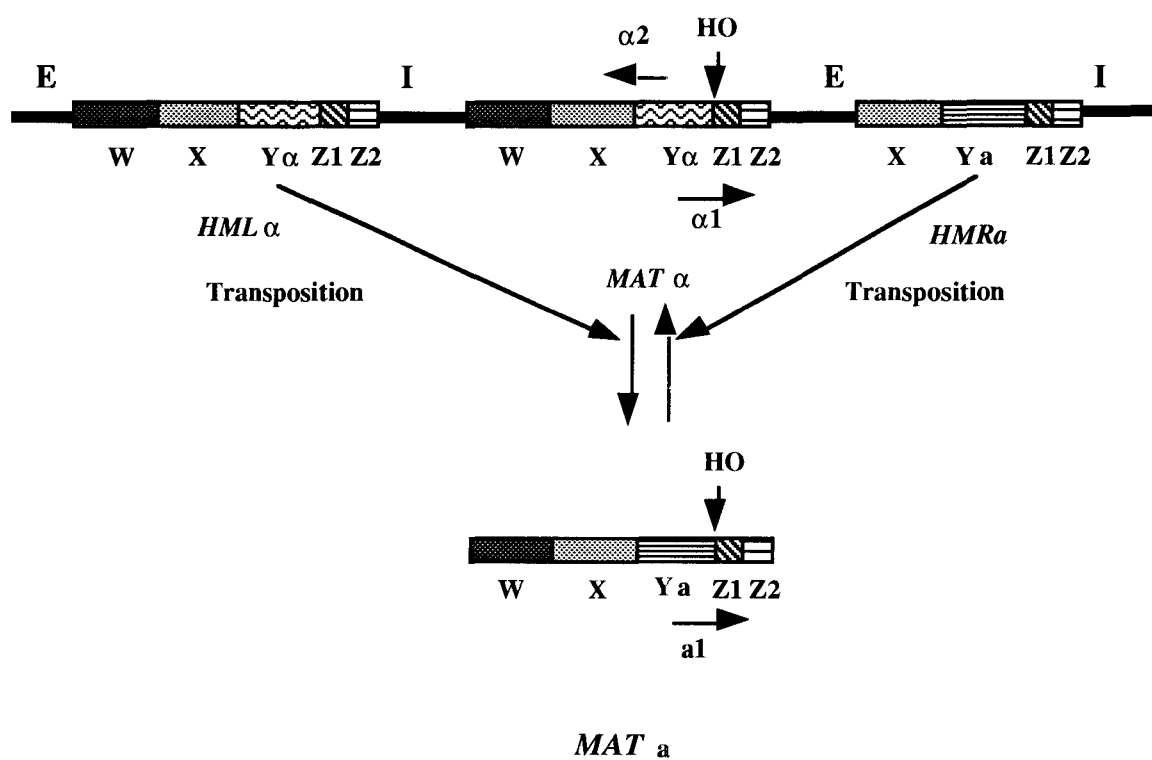


Figure n°3: Organisation des loci impliqués dans la commutation du signe sexuel chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Cette exonucléase n'a pas encore été identifiée, par contre, son activité est sensiblement diminuée dans les souches portant une mutation *rad 50* et la cinétique de la commutation est retardée (Sugawara et Haber, 1992). De plus, il a été démontré que la partie proximale de la coupure bicaténaire n'est pas dégradée. Cette digestion asymétrique (dépendante du site donneur *HML* ou *HMR*) est l'une des caractéristiques spécifiques d'un appareillage de commutation intact. Lorsqu'un fragment de 117-pb correspondant au site de coupure de *MAT* est inséré dans une autre région chromosomique, l'activité exonucléasique 5'-3' s'effectue sur les deux parties de la coupure (Sugawara et Haber, 1992; Fishman-Lobel et Haber, J.E., 1992). La même constatation a été faite au niveau du locus *MAT* lorsque *HML* et *HMR* sont délétés (White et Haber, 1990). Ainsi, l'extrémité 5' de *MAT-Z* est dégradée et pas la 3'.

5.3.3. Invasion du site donneur et extension d'amorce

L'extrémité 3' de *MAT-Z* envahit le locus donneur *HML* ou *HMR* et s'apparie avec leur région Z. La région Y est dégradée jusqu'à ce qu'une région présentant une homologie avec X soit exposée. A ce point, *MAT* est apparié avec *HML* ou *HMR* à la fois du côté gauche X et du côté droit Z1. La région Y est copiée pour remplacer la région perdue de *MAT* (White et Haber, 1990).

5.3.4. Les étapes finales de la commutation

Après l'invasion des brins et l'extension et avant même que la commutation n'ait eu lieu, un certain nombre d'événements (non encore définis) se succèdent. Les modèles conventionnels de la réparation des cassures d'ADN peuvent supposer l'existence ou la formation de jonctions symétriques dites de Holliday, qui après résolution, permettent les conversions de gène avec ou sans crossing-over. Il a été montré que les "crossing-overs" ne sont jamais associés avec le phénomène de commutation. McGill et coll., (1989) ont suggéré un mécanisme alternatif de résolution de ces structures où des topoisomérases peuvent dérouler les deux brins nouvellement synthétisés des brins amorces du locus *HML*

ou *HMR* , de ce fait, les loci silencieux contiennent l'ADN original et *MAT* hérite de la séquence néosynthétisée sans établissement de "crossing-overs".

5.4. Programmation et choix de la direction de déplacement de la cassette

L'aspect le plus remarquable de la commutation est la propension de *MAT* a à recevoir l'information de *HML* α , même si *HMR* a a les capacités d'être le donneur (Klar et coll., 1982). De même, *MAT* α interagit 5 à 10 fois plus avec *HMR* a qu'avec *HML* α . Les séquences *Y* α ou *Y*a n'affectent en aucun cas le choix du locus donneur. Ce dernier pourrait être sous le contrôle de gènes agissant en trans. Cet aspect de la commutation reste encore à élucider.

5.5. Les protéines régulatrices codées par les gènes *MAT* a et *MAT* α

Les cellules haploïdes α synthétisent des protéines spécifiques de *MAT* α qui sont absentes dans les cellules a et *vice versa*. La même constatation a été faite pour les transcrits confirmant l'hypothèse proposée par Strathern et coll., (1980) qui suggèrent que *MAT* α est constitué de deux cistrons α 1 et α 2. Le cistron α 1 code pour un activateur ou régulateur positif des gènes spécifiques de α , et le cistron α 2 code pour un répresseur des gènes spécifiques de a. En ce qui concerne le produit du gène *MAT* a, aucune fonction ne lui a été attribuée jusqu'à ce jour dans les cellules haploïde a. Par contre, a1 en association avec α 2 (complexe a1- α 2) dans les cellules diploïdes a/ α inhibe l'expression du cistron α 1, des gènes spécifiques de l'haploïdie et du gène *RME* 1 (Kassir et Simchen, 1976; Rine et coll., 1981). Le produit du gène *RME* 1 est un régulateur négatif de l'expression des gènes spécifiques de a/ α actifs dans les cellules qui expriment les deux informations a et α (Mitchell, A.P. et Herskowitz, I., 1986). Ainsi, le polypeptide a2 joue un rôle de répresseur dans deux voies différentes. En effet, il a été démontré que la protéine α 2 reconnaît une séquence nucléotidique de 32-pb située au début d'un gène spécifique de a , *STE* 6 (Johnson et Herskowitz, 1985), alors que le complexe a1- α 2 reconnaît une autre séquence de 20 ou 28-pb dans la région non transcrite du cistron α 1 (Miller et coll., 1985;

Siliciano et Tatchell, 1986) et des gènes spécifiques de l'haploïdie (Dietzel et Kurjan, 1987; Siliciano et Tatchell, 1986). Enfin, *a2* et *a1* possèdent des domaines homéo qui sont considérés comme des domaines de fixation à l'ADN (Shepherd et coll., 1984).

5.6. La Répression des loci *HML* et *HMR*

Les loci *HML* et *HMR* de *Saccharomyces cerevisiae* sont silencieux par un effet de position équivalent à l'inactivation du chromosome X des femelles des mammifères (Walker et coll., 1991), et à la bigarrure "variégation" due aux effets de position chez la drosophile. Lorsqu'une translocation joint l'intérieur d'une région hétérochromatinienne centromérique à une région normalement euchromatique, une zone d'inactivation se propage de celle-là dans celle-ci sur plusieurs centaines de kilobases, zone qui couvre donc souvent plusieurs gènes qui vont se retrouver inactivés (Henikoff, 1990), (Tartof et Bremer, 1990). Le locus *MAT* actif se trouve non loin du centromère et les loci réprimés se trouvent aux deux bouts du chromosome III, non loin des télomères, suggérant que peut-être leur répression en *cis* dérive à l'origine de celle qui s'opère sur tout gène inséré très près d'un télomère. Les télomères sont les extrémités chromosomiques des eucaryotes, jouant un rôle très important dans la stabilité et la réplication des chromosomes linéaires des cellules eucaryotes (Blackburn, 1991). Les observations cytologiques faites chez les plantes, les insectes, et les mammifères ont révélé la structure hétérochromatinienne des télomères. De plus, les télomères de ces derniers ainsi que ceux des trypanosomes semblent être associés à l'enveloppe nucléaire (Chung et coll., 1990; Hochstrasser et coll., 1986; Rawlins et Shaw, 1990; Traverse et Pardue, 1989).

La répression est établie grâce à des interactions très complexes des produits de gènes agissant en trans (*RAP1*, *ABF1*, *SIR1*, *SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *NAT1*, *ARD1*, et *HHF2* pour l'histone H4) sur des sites de répression agissant en *cis* trouvés de part et d'autre de *HML* et *HMR* (revue par Laurenson et Rine, 1993).

5.7. Les sites de répression agissant en *cis*

L'établissement de la répression et son maintien dépendent de deux sites répresseurs appelés *E* et *I* (Abraham et coll., 1984; Feldman et coll., 1984). Au niveau de *HML*, la présence de *E* ou *I* uniquement est suffisante pour la répression alors qu'au niveau de *HMR*, la délétion de *I* (E^+I^-) n'affecte pas la répression, mais la délétion de *E* (E^-I^+) lève la répression. Parmi ces deux sites, le site *E* a fait l'objet de plusieurs travaux de génétique qui ont permis l'identification de trois domaines fonctionnels (Brand et coll., 1985). Le premier domaine constitue le site de fixation de la protéine RAP1 qui se fixe aussi sur les séquences répétitives $(C_1-3A)_n$ spécifiques des télomères (Shore et Nasmyth, 1987). Le second domaine constitue le site de fixation d'une deuxième protéine ABF1 (Shore et Nasmyth, 1987). Enfin, le troisième domaine fonctionnel possède une séquence consensus dite *ARS* trouvée également au niveau de l'origine de réplication de l'ADN de la levure (Huberman et coll., 1988). Sur cette séquence *ARS* se fixe un complexe protéique appelé ORC (pour complexe reconnaissant l'origine) constitué de 6 sous-unités différentes (Bell et Stillman, 1992). Il a été suggéré que la réplication de l'ADN joue un rôle important dans l'établissement de la répression (Miller et Nasmyth, 1984). Les auteurs ont montré en utilisant une souche de *Saccharomyces cerevisiae* M28 (*HML* a *MAT* Δ *HMR* a *sir3* *ts*) capable de transcrire le cistron *a1* à partir des loci silencieux aux températures restrictives et non aux températures permissives, que la répression par les protéines SIR n'a pas lieu dans les cellules bloquées en phase G1 par le facteur α , et qu'elle a lieu durant la phase S quand les cellules ne sont plus inhibées. D'autre part l'utilisation d'un inhibiteur de la synthèse d'ADN (l'hydroxyde d'urée) et un inhibiteur de la mitose (methyl-benzimidazol-2-yl carbamate, MBC), montre que l'hydroxyde d'urée lève la répression alors que le MBC ne le fait pas, ce qui suggère que la réplication de l'ADN est nécessaire pour la répression. En effet, une mutation de *HMR-E* bloque son activité comme origine de réplication et lève la répression (Rivier et Rine, 1992). Une autre mutation affectant le produit du gène *ORC2* (*orc2-1*) entraîne l'arrêt du cycle cellulaire juste avant la réplication de l'ADN et par conséquent l'activation de *HML* et *HMR* (Foss et coll., 1993).

5.8. Les gènes qui agissent en trans dans le mécanisme de la répression

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la chromatine inaccessible aux facteurs de transcriptions (donc réduite au silence) est trouvée au niveau des loci *HML* et *HMR* codant pour les cassettes cryptiques du type conjuguant et au niveau des télomères (Laurenson et Rine, 1993). Tous les gènes proches ou contenus dans ces régions sont transcriptionnellement réprimés (Gottschling et coll., 1990). Cette répression est sous le contrôle de plusieurs produits de gènes agissant en trans dont toute défaillance lèvera la répression (Sandell et Zakian, 1992).

5.9. La répression au niveau des télomères

Actuellement, la seule protéine majeure de type non histone connue comme ayant un rôle fonctionnel au niveau des télomères est la protéine RAP1 qui est à la fois un répresseur et un activateur de la transcription (Shore et Nasmyth, 1987). Cette protéine est retrouvée dans les télosomes relargués du noyau et se fixe sur les séquences répétées poly (TG1-3) spécifiques des télomères à raison d'une molécule par 18-pb (Gilson et coll., 1993). Enfin, tout changement dans le taux d'expression de RAP1 affecte la longueur des télomères et sa surproduction augmente à la fois le pourcentage de perte de chromosome et les recombinaisons (Conrad et coll., 1990). Cette répression télomérique, comme celle observée au niveau des loci *HML* et *HMR* nécessite l'action des produits des gènes régulateurs de l'information silencieuse *SIR2-4* et *RAP1* (Aparicio et coll., 1991). Par contre, toute mutation du gène *SIR1* n'affecte en rien la répression télomérique (Aparicio et coll., 1991), mais déstabilise la répression de *HML*. Il a été récemment démontré que la répression télomérique est plus stable lorsque la protéine *SIR1* est recrutée au niveau des télomères via le domaine de fixation à l'ADN de la protéine *GAL4*, en absence des séquences *ARS* (Chien et coll., 1993). Les auteurs suggèrent que le rôle de l'ORC dans l'établissement de la répression est limité à recruter *SIR1*. En conclusion, les trois facteurs se fixant sur l'ADN, *RAP1*, *ORC* et *ABF1* et probablement le ligand *SIR1*, semblent essentiels dans l'organisation de la chromatine silencieuse en nucléole. Les protéines *SIR2-*

4 et les parties N-terminales des histones H3 et H4 joueraient plutôt un rôle dans la propagation et le maintien de cet état (Laurenson et Rine, 1993; Aparicio et coll., 1991; Johnson et coll., 1990). Le fait que les loci silencieux et les télomères soient réfractaires de manière dépendante des gènes *SIR* aux enzymes qui méthylent l'ADN *in vivo* (Gottschling, 1992), montre que la répression est un moyen de séquestration de l'ADN.

5.10. Rôles des protéines SIR1-4

Les quatre gènes codant pour les protéines SIR1-4 ont été clonés et séquencés (Shore et coll., 1984; Ivy et coll., 1986). Ils sont respectivement localisés sur les chromosomes *XI-D*, *IV-G*, *XII-D*, et *IV-D* (D pour bras droit et G pour bras gauche) (Ivy et coll., 1985). Le rôle précis de leurs produits dans la répression reste encore à déterminer. Aucune protéine SIR ne se fixe sur l'ADN de façon directe.

Une évidence biochimique récente a montré que les protéines SIR2 et SIR3 agissent sur la structure de la chromatine (Braunstein et coll., 1993): les loci silencieux du type conjuguant ainsi que les télomères sont enveloppés dans des nucléosomes hypoacétylés par comparaison avec les nucléosomes de la chromatine active. Ces auteurs ont montré que cette différence est liée à SIR2 et à SIR3. De plus, la surproduction de la protéine SIR2 et non celle de SIR3 induit une hypoacétylation généralisée. Par conséquent SIR2 pourrait être soit une histone déacétylase soit un inhibiteur d'histone acétylase. Des travaux sur SIR3 ont montré que la surexpression de *SIR3* entraîne un prolongement de la chromatine silencieuse (Renauld et coll., 1993). SIR3 interagit comme SIR4 avec les histones H3 et H4. Ces dernières et plus précisément leurs régions N-terminales, sont nécessaires pour l'interaction de SIR3 avec la chromatine télomérique et la localisation périnucléaire des télomères de *Saccharomyces cerevisiae* (Hecht et coll., 1995). Le rôle de protéines ubiquitaires (H3 et H4) dans un mécanisme aussi spécifique tel que la répression par effet de position semble paradoxal. En effet, la délétion ou la substitution non conservatrice d'acides aminés dans une séquence extrêmement conservée de la partie N-terminale de H4 (résidus 16 à 19; Lys-Arg-His-Arg) permet de supprimer la répression et activer les loci

HML et *HMR* (Kayne et coll., 1988; Megee et coll., 1990). Une mutation ponctuelle par substitution d'un seul acide aminé de SIR3 supprime l'effet engendré par la mutation de H4, donc rétablit la répression (Johnson et coll., 1990, 1992), ce qui suggère une interaction directe ou indirecte entre ces deux protéines. Enfin, il a été démontré que SIR3 qui se fixe sur RAP1, interagit avec elle même et avec SIR4 (Formation d'homodimères et d'hétérodimères) grâce à leur domaine C-terminal. Ces interactions ont permis d'avancer l'hypothèse suivante: RAP1 initie la répression en recrutant les protéines SIR3 et SIR4 au niveau du chromosome à travers des interactions de type protéine-protéine ce qui conforte le modèle selon lequel SIR3 et SIR4 joueraient un rôle structural dans le maintien de la chromatine dans un état silencieux et ceci au niveau des silencers agissant *en cis* (Moretti et coll., 1994). C'est ce qui a permis de proposer un modèle de formation de l'hétérochromatine télomérique qui est défini comme étant un assemblage multimérique de protéines de type histone et non histone. En conclusion, RAP1 se fixe sur les séquences poly (C1-A3) ou *ARS* et recrute les protéines SIR3 et SIR4 au niveau des télomères qui sont elles même responsables de la localisation périnucléaire des télomères. De plus, le domaine C-terminal de SIR4 présente des homologues avec les lamines de l'enveloppe nucléaire (Diffley et Stillmann, 1989). De plus, SIR3 et SIR4 peuvent former des homodimères et des hétérodimères et interagissent avec H3 et H4 (nécessaires pour la répression). C'est alors l'ensemble de ces interactions qui induit la formation de l'hétérochromatine silencieuse et sa localisation périnucléaire.

Une deuxième fonction particulière a été attribuée à *SIR2*. En effet, une mutation *sir2* affecte les recombinaisons de l'ADN ribosomal de *Saccharomyces cerevisiae* (Gottlieb et Esposito, 1989). Il a été récemment publié que SIR4, ou plus généralement le complexe SIR, a un rôle fonctionnel dans le contrôle du processus de vieillissement chez *Saccharomyces cerevisiae* (Kennedy et coll., 1995). Ces auteurs ont montré que les mutations $\Delta sir4$ (Knock Out pour le gène *SIR4*), *sir4-42* (*SIR4* tronquée du côté C-terminal) et anti-*sir4* (surproduction du C-terminal de *SIR4*), permettent la résistance aux "stress" et allègent la répression au niveau des loci *HM*. $\Delta sir4$ et *sir4-42* lèvent la

répression au niveau des télomères et raccourcissent la longueur de ces derniers. Par contre, *sir4-42* et *anti-sir4* induisent un prolongement de la durée de vie des levures alors que Δ *sir4* la raccourcit. Les auteurs avancent que la durée de vie est sous le contrôle d'un locus nommé *Age*, non lié aux loci *HM* ni aux télomères, mais régulé par les protéines SIR. La répression de ce locus *Age* par *SIR4* prolongerait la durée de vie des levures. Effectivement, la mutation *sir4-42* empêche le recrutement de SIR2 et SIR3 au niveau des loci *HM* et aux télomères sachant qu'il se fait par le domaine C-terminal. Ceci permettrait une disponibilité de ces protéines au niveau du locus *Age* qui sera réprimé. Par conséquent, la durée de vie de *Saccharomyces cerevisiae* est prolongée.

6. LE MODE DE PROPAGATION DES *TRYPANOSOMATIDAE*

La propagation des *Trypanosomatidae* est actuellement très controversée, elle est l'objet d'un débat scientifique fortement animé par deux écoles qui défendent soit l'existence de la reproduction sexuée, soit la propagation clonale de ces organismes.

6.1. Méthodologie et approches expérimentales

Quatre principales méthodes ont été utilisées par les différents laboratoires afin d'examiner le mode de propagation des *Trypanosomatidae*.

6.1.1. La méthode cytologique

Cette méthode permet l'observation de la gamétogenèse, la fusion des gamètes et la caryogamie. Néanmoins, ces observations ne suffisent pas à elles seules pour prouver l'existence de la reproduction sexuelle. Pour cela, il faudrait prouver l'existence de la méiose, chose très difficile dans le cas des *Trypanosomatidae*, car il est pratiquement impossible de visualiser les chromosomes chez ces organismes. La chromatine nucléaire paraît relâchée et non structurée (Vickerman et Preston, 1970).

6.1.2. La méthode biochimique: analyses isoenzymatiques

Le principe de cette méthode est très simple: elle permet de détecter une substitution d'acides aminés dans la chaîne polypeptidique d'une enzyme, donc une substitution nucléotidique au niveau du gène codant pour cette dernière. Cette substitution se traduit par une différence de mobilité électrophorétique d'une enzyme due à une différence de charges dans les extraits des clones analysés. Cette technique permet de renseigner l'utilisateur sur la ploïdie de l'organisme étudié, d'identifier les hybrides et de déterminer le mécanisme de leur genèse, à condition d'y associer les méthodes statistiques de la génétique des populations.

6.1.3. Les méthodes de biologie moléculaire

La quantification de l'ADN nucléaire par cytofluorométrie et l'étude de la cinétique de renaturation de l'ADN permettent de déterminer la ploïdie d'un *Trypanosomatidae* et de savoir s'il subit à un moment donné de son cycle évolutif une méiose (Borst et coll., 1982). De plus, l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments d'ADN produits par les enzymes de restriction (RFLPs) (Gibson et coll., 1985) et la caractérisation des chromosomes des *Trypanosomatidae* grâce à l'électrophorèse en champs pulsés (Van der Ploeg et coll., 1984a; Pages et coll., 1989; Bastien et coll., 1992) permettent d'identifier le sujet hybride, et de connaître sa ploïdie. Si l'organisme est diploïde, on peut savoir s'il est homozygote ou hétérozygote pour un gène donné et enfin expliquer par quel mécanisme il a été obtenu en le comparant avec les souches parentales (Paindavoine et coll., 1986; Wells et coll., 1987). Enfin, une dernière technique la RAPD (ADN polymorphique amplifié au hasard) est une PCR (réaction de polymérisation en chaîne) qui utilise comme amorces des oligonucléotides courts de séquences aléatoires (Williams et coll., 1990). Cette technique a été couplée à la MLEE (analyses des variations électrophorétiques d'enzymes) et aux méthodes d'analyses phylogénétiques pour proposer une propagation clonale pour *Trypanosoma cruzi* (Tibayrenc et coll., 1993) et *T. brucei* (Stevens et Tibayrenc, 1995).

6.1.4. Utilisation des marqueurs de sélection

Deux souches parasitaires clonées A et B, porteuses de marqueurs distincts, peuvent être mixées en proportions égales et introduites dans le cycle évolutif au sein d'un même organisme qui est en général le vecteur. Ensuite, les parasites seront prélevés et l'on procédera à la sélection des hybrides portant les deux marqueurs à la fois, ce qui constitue une preuve d'établissement d'échanges génétiques. Un exemple précis de marqueur utilisé est la résistance aux médicaments et la sélection des hybrides double résistantsse fera sur un milieu sélectif (Gibson et Whittington., 1993). Ces hybrides sont ensuite soumis à d'autres analyses complémentaires citées au paravent.

6.2. Les évidences en faveur de l'existence d'une reproduction sexuée chez les *Trypanosomatidae*

6.2.1. Cas de *Trypanosoma brucei*

Les premiers arguments en faveur de l'existence d'un processus d'échanges génétiques chez le trypanosome africain *T. brucei* se sont accumulés à partir d'analyses de variation de mobilité électrophorétique d'enzymes dans les populations naturelles de ce parasite (Tait., 1980). En plus des échanges génétiques, l'auteur a conclu sur la diploïdie et l'existence de recombinaisons génétiques chez *T. brucei*. Puis, grâce à des croisements expérimentaux entre deux clones, Jenni et coll., (1986) ont été les premiers à obtenir des hybrides et à démontrer que les échanges génétiques ont lieu chez la glossine vecteur de *T. brucei*. Les auteurs ont noté que les hybrides ne possédaient pas quelques fragments génomiques caractéristiques d'un des parents. Les hybrides obtenus par Jenni et coll., (1986), ont été analysés du point de vu ADN par cytofluorométrie, Southern-blot et électrophorèse en champs pulsés (Paindavoine et coll., 1986). Les auteurs ont suggéré que les hybrides ont pour origine la fusion de cellules parentales diploïdes donnant naissance à une cellule tétraploïde. Cette dernière a subi une méiose pour former deux cellules métacycliques sub-diploïdes. Une fois dans l'hôte mammifère, une deuxième fusion a lieu

(Cellule sub-tetraploïde), qui au cours de son développement chez l'hôte mammifère va perdre progressivement de l'ADN et retrouver un état diploïde. Wells et coll., 1987 ont montré que ces hybrides contiennent plus d'ADN que les parents (forme procyclique 1.7 fois plus d'ADN; forme sanguicole 1.7 à 1.9 fois plus d'ADN). En effet, les hybrides semblent contenir le double en minichromosomes qui représente seulement 20% de l'ADN supplémentaire. Par ailleurs, ils ont remarqué l'absence chez les hybrides d'un chromosome parental de 500-kb .

Au cours de la même année, un autre clone hybride a été obtenu. Cet hybride présentait une quantité d'ADN nucléaire équivalente à celle des parents (Sternberg et coll., 1987). L'auteur a confirmé que l'ADN kinétoplastique est hérité de façon uniparentale et soulève la difficulté à préciser le mécanisme de ces échanges génétiques. Effectivement, la ségrégation d'allèles de sept loci se fait selon les lois Mendéliennes. Par contre, au niveau de deux autres loci, ces lois classiques ne sont pas applicables. En effet, les souches parentales sont des variants homozygotes pour ces deux gènes et les hybrides le sont aussi.

Tous les hybrides obtenus expérimentalement sont issus de souches parentales provenant de régions épidémiques différentes. Outre cela, l'existence d'échanges génétiques dans une population naturelle de *T. brucei* fait l'objet d'une controverse. Récemment, un croisement a été réussi entre deux clones de *T. brucei* appartenant à la même région épidémique (Degen et coll., 1995). Les auteurs ont utilisé une démarche se rapprochant le plus que possible des conditions naturelles d'infection.

En conclusion, il est admis que *T. brucei* est diploïde à tous les stades évolutifs, son contenu en ADN peut varier chez les hybrides mais pas sa ploïdie. Les faibles pourcentages d'obtention d'hybrides expérimentaux indiquent clairement que les échanges génétiques ne sont pas des événements obligatoires dans le cycle vital de *T. brucei*. Par contre, ces expériences ont toutes montré l'existence de la méiose (de façon indirecte), d'une ségrégation d'allèles et de recombinaison génétiques chez cet organisme. L'absence d'observations cytologiques dans ce domaine est un facteur limitant pour l'élucidation du mécanisme de ces échanges (Tait., 1990)

6.2.2. Cas des leishmanies

Les leishmanies sont considérées comme des organismes eucaryotes unicellulaires se multipliant par fission binaire. Malgré les nombreuses observations en faveur d'éventuels échanges génétiques, l'existence d'une reproduction sexuée dans le genre *Leishmania* reste encore à prouver. Cela vient du fait que ni la méiose, ni la formation de gamètes, n'ont été observés chez ces organismes.

Les premières hypothèses sur l'existence d'échanges génétiques dans le genre *Leishmania* ont été émises à la suite d'analyses de zymodèmes. Maazoun et coll., (1981) ont suggéré que les variants isoenzymatiques observés dans le genre *Leishmania*, seraient une conséquence d'échanges génétiques. Le blanch et coll., (1986), en réalisant une analyse numérique sur différents profils isoenzymatiques, ont suggéré à leur tour que pour pouvoir expliquer certains profils, il faudrait admettre que les *Leishmania spp* sont des organismes diploïdes, capables d'échanges génétiques. Plusieurs équipes ont tenté de prouver expérimentalement ces échanges. Ils ont essayé sans succès d'obtenir des hybrides en infectant un même vecteur avec des leishmanies portant des caractères différents (Gradoni et coll., 1986; Evans et coll., 1989; Panton et coll., 1991). Par ailleurs, d'autres évidences en faveur de l'existence d'une reproduction sexuée ont été apportées par les travaux de Pages et coll., (1989), qui suggèrent l'établissement d'amplification et de délétion d'ADN chez *L. infantum* et l'existence éventuelle d'échanges génétiques chez ces organismes. D'autre part, Lanotte et Rioux, (1990) ont montré des fusions cellulaires chez les espèces *L. donovani infantum* et *L. tropica.*, en utilisant une technique cinématographique. De plus, ils suggèrent l'existence d'une polarité. En effet, un des deux promastigotes fusionnant présentait toujours une protubérance à son extrémité postérieure qu'ils ont nommé "bec de conjugaison". Une technique analogue, la photo micrographie, a été utilisée dans le même contexte mais chez un autre *Trypanosomatidae*, *Herpetomonas megasetae* (Sousa, 1994). L'auteur a observé des fusions cellulaires où l'un des promastigotes hérite du noyau de l'autre. Cette caryogamie constitue une évidence en faveur des échanges génétiques chez les *Trypanosomatidae*.

Des hybrides naturels ont été caractérisés en combinant l'électrophorèse isoenzymatique et la technique du Southern-blot suivie d'hybridation de sondes ADN spécifiques d'espèce ou non. Kelly et coll., (1991) ont isolé deux souches possédant des caractères génotypiques et phénotypiques d'un hybride de *L. major* et *L. arabica*. De plus, toutes les sondes utilisées ont donné des profils d'hybridation en faveur de l'hétérozygotie et la diploïdie, sauf pour le cas d'une sonde d'ADN kinétoplastique où l'hybride hérite vraisemblablement de façon uniparentale l'ADNk, celui de *L. major* dans ce cas précis. Ces auteurs ont proposé des critères sur lesquels on pourrait se baser pour déterminer si l'hybride observé est le résultat d'un échange génétique ou non: 1) les souches parentales doivent avoir le même vecteur, la même répartition géographique et le même réservoir animal. 2) le génotype de l'hybride doit être recombinant et l'héritage des caractéristiques génétiques parentales doivent se faire selon les lois Mendéliennes. Le choix des sondes ADN est primordial pour établir la relation de l'hybride avec ses parents en expliquant les différences entre le profil d'hybridation de la descendance et ceux des parents. 3) la transmission des gènes nucléaires et des gènes mitochondriaux doit se faire de façon indépendante. Un autre hybride de *L. panamensis* et *L. braziliensis* a été caractérisé initialement par le profil isoenzymatique et immunologique en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques (Darce et coll., 1991), puis récemment, par Southern-blot et hybridation de sondes ADN (Belly et coll., 1994).

En conclusion, toutes les évidences apportées en faveur de la reproduction sexuée dans le genre *Leishmania* ne constituent pas en soi des preuves formelles. Dans le cas des hybrides observés, la quantification de l'ADN n'a pas été réalisée. De plus, la notion de ploïdie pour le genre *Leishmania* reste encore à définir. En ce qui concerne les échanges génétiques, il n'y a aucun doute sur leur existence. Les hybrides sont les fruits de ces derniers, avant d'entamer une propagation clonale. La fréquence de ces croisements est inférieure à 4×10^{-4} (Panton et coll., 1991).

6.3. La théorie clonale

Tibayrenc et coll., (1990) ont proposé la multiplication clonale comme seul mode de reproduction dans les populations naturelles de sept grands groupes de protozoaires parasites. Parmi ces protozoaires figurent les *Plasmodium*, les *Leishmania* et les *Trypanosoma*. Les auteurs ont utilisé les méthodes de la génétique des populations pour affirmer leur théorie en exploitant toutes les données publiées sur la variabilité biochimique de ces parasites. Ils ont noté une déviation par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg pour ces populations. Cela signifie l'absence de ségrégation alléliques à un loci donné. D'autre part, ils démontrent l'existence d'un grand déséquilibre de liaisons entre tous les loci considérés, une prédominance de certains génotypes multilocus ubiquitaires et l'absence d'autres génotypes théoriquement concevables. La signification de ces remarques est l'absence des recombinaisons génétiques chez ces protozoaires. Sachant que la reproduction sexuée implique une ségrégation des allèles parentaux selon les lois classiques de Mendel et l'établissement de recombinaisons génétiques, les auteurs ont conclu sur une propagation clonale de ces organismes.

Les affirmations en faveur de la multiplication clonale sont acceptables pour *T. cruzi* (Tibayrenc et coll., 1981c, 1990, 1993; Tait., 1983). Par contre, elles sont contradictoires avec les observations en faveur de l'existence d'échanges génétiques d'une part chez *Leishmania* et *T. brucei* (cf. § précédents), d'autre part dans le genre *Plasmodium* où il a été démontré que le stade schizonte pouvait se différencier en macro- et microgamète qui fusionnent pour donner un zygote (Garham., 1966). Cette observation cytologique a été ensuite confirmée par la mise en évidence de la méiose et des recombinaisons génétiques chez les espèces de *Plasmodium* (Walliker et coll., 1971). Par ailleurs, les méthodes de la génétique des populations ont été établies pour des organismes dont la reproduction sexuée était une évidence. Ces règles pourraient ne pas être applicables dans le cas des *Trypanosomatidae*. En effet, le génome de ces organismes possède des caractéristiques spécifiques telles que la plasticité caryotypique (Cruz et coll., 1993), les polymorphismes chromosomiques (Bastien et coll., 1992), l'amplification et la délétion d'ADN (Pages et

coll., 1989) et enfin, une variabilité de la ploïdie selon le chromosome ou le gène considéré (Bastien et coll., 1992).

Toutes ces caractéristiques nous laissent penser que *T. brucei* et *Leishmania* possèdent une reproduction sexuée non obligatoire pour l'accomplissement du cycle évolutif et que ces parasites se multiplient le plus souvent de manière clonale. Cette reproduction sexuée doit être différente du modèle classique de méiose, formation de gamètes et fusion pour rétablir la ploïdie. En d'autres termes, ces organismes pourraient nous dévoiler un nouveau mécanisme de conjugaison n'obéissant pas aux lois Mendéliennes et aux règles classiques de la génétique des populations.



BUT DU TRAVAIL

But du travail

Le glutathion ou γ -Glu-Cys-Gly est un tripeptide d'origine non protéique, dont l'acide glutamique assure sa liaison peptidique avec la cystéine par l'intermédiaire de son groupement carboxyle γ et non α . L'un des rôles importants du glutathion est la protection des cellules du "stress" oxydatif et de l'action des radicaux libres. Le produit final de ces réactions est le glutathion oxydé, lui même toxique pour les cellules. Cependant, le glutathion oxydé ne s'accumule pas dans les cellules, puisqu'il est réduit par les enzymes tels que la glutathion-réductase (GR) chez les mammifères. Chez les *Trypanosomatidae*, l'équivalent fonctionnel de la (GR) est représenté par la trypanothion-réductase (TR). Le substrat de la TR est un conjugué de glutathion et de spermidine, nommé trypanothion, dont la formule est: N1, N8-bis [glutathionyl] spermidine.

D'autre part, une autre catégorie d'enzymes ubiquitaires et multifonctionnels, les glutathion S-transférases (GST), peuvent également intervenir dans les processus de détoxification et dans la protection contre "le stress oxydatif". Les GST catalysent l'addition du groupement thiol du glutathion sur une large variété de substrats électrophiles tels que les époxides et les quinones. Les conjugués ainsi formés deviennent plus polaires, donc facilement éliminables.

Plusieurs travaux expliquent l'intérêt que nous avons porté à l'étude des protéines des leishmanies, ayant une affinité pour le glutathion. En effet, il a été démontré que l'inhibition de la synthèse du glutathion par le buthionine sulfoximine peut protéger les souris contre une infection par *Trypanosoma brucei* (Arrick et coll., 1981). De plus, un rôle immunoprotecteur a été clairement montré dans divers modèles animaux pour la GST de *Schistosoma mansoni* (Balloul et coll., 1987), de même, chez le mouton pour la GST de *Fasciola hepatica* (Sexton et coll., 1990). De plus, aucune GST n'a été décrite chez les *Trypanosomatidae*, à l'exception faite d'une étude faisant état d'une protéine du stade épimastigote de *T. cruzi*, ayant un poids moléculaire de 37 kDa, et exprimant une activité de type GST (Yawetz et coll., 1981). Récemment, il a été montré dans le modèle *T. cruzi* que l'immunisation de souris Balb/c avec des protéines éluées spécifiquement d'une

colonne de glutathion, induit une protection significative contre une infection d'épreuve (Plumas-Marty., 1993).

Le but de notre travail est d'essayer d'identifier des molécules impliquées dans le métabolisme du glutathion chez les leishmanies, qui pourraient être utilisées dans le développement de nouvelles stratégies vaccinales et/ou pharmaceutiques afin de lutter contre les leishmanioses.

Nous aborderons ce travail en deux principaux volets.

Le premier volet consistera à purifier par chromatographie d'affinité des protéines qui se fixent sur le glutathion et à produire un sérum dirigé contre ces LmGbp (*L. major* glutathione-binding proteins). Ce sérum (anti-LmGbp) nous permettra la caractérisation immunochimique et biochimique des LmGbp.

Le deuxième volet inclura la construction d'une banque d'expression d'ADNc, qui sera criblée à l'aide du sérum anti-LmGbp. Les clones ADNc isolés, seront séquencés et nous permettrons d'analyser la structure, l'organisation et l'expression des gènes codant pour ces protéines. Enfin, grâce aux techniques de la génétique moléculaire moderne, la fonction de ce(s) gène(s) dans la biologie du parasite, sera abordée.

TRAVAUX PERSONNELS

Article n° 1

Caractérisation d'antigènes de *Leishmania*, localisés dans des vésicules cytoplasmiques assimilables aux endosomes des eucaryotes supérieurs.

Dans cette article, grâce à des techniques immunologiques et à leur couplage aux techniques de microscopie, nous avons caractérisé des antigènes de *L. major* qui pourraient jouer un rôle dans la physiologie du parasite et/ou dans les interactions hôte-parasite. Les principaux résultats obtenus sont les suivants:

1- Nous avons purifié par chromatographie d'affinité sur une colonne de glutathion-agarose des antigènes de *L. major* (LmGbp). L'analyse par électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) a permis d'identifier après coloration au nitrate d'argent deux protéines majeures de poids moléculaire apparents de 32 et 66 kDa.

2- L'immunsérum (anti-LmGbp) testé par Western-blot sur un extrait total de promastigote de *L. major* a révélé plusieurs composants de poids moléculaire de 32, 37, 50, 66, 90 et 120 kDa. L'analyse de réactivité du sérum anti-LmGbp avec les extraits de différentes espèces de *Leishmania* révèle une communauté antigénique très marquée pour la p66.

3- Les LmGbp sont détectées chez les amastigotes, dans le cytoplasme des macrophages infectés, et dans les composants d'excrétion / sécrétion (ES) de promastigotes.

4- L'utilisation en immunofluorescence indirecte des anticorps purifiés par affinité sur la p66, montre que cette dernière est localisée dans des vésicules intracytoplasmiques.

5-L'immunolocalisation des LmGbp, à l'aide de la microscopie électronique et de l'immunsérum anti-LmGbp a montré que ces antigènes sont principalement associés à des structures multivésiculaires qui ressemblent aux endosomes des eucaryotes supérieurs.

Chez les *Trypanosomatidae*, l'absence de marqueurs des divers organites cytoplasmiques empêche l'élucidation des relations qui existent entre les différents compartiments vésiculaires du réseau très complexe localisé entre le noyau et la poche flagellaire. Une caractérisation plus approfondie de la p66, et la production d'un immunsérum monospécifique, permettrait d'apporter quelques éléments de réponse à cette question.

Parasitology (1993), **107**, 497-507.

**CHARACTERIZATION OF A LEISHMANIA ANTIGEN ASSOCIATED
WITH CYTOPLASMIC VESICLES RESEMBLING ENDOSOMAL-LIKE
STRUCTURE**

Running title: Leishmania antigen associated with endosomal-like structure

**B. YAHIAOUI¹, M. LOYENS¹, A. TAIBI¹, R. SCHÖNECK¹, J.F.
DUBREMETZ², & M.A.OUAISSI^{1*}**

1-Research Laboratory on Trypanosomatids, INSERM U 167, Institut Pasteur, Lille and

2-INSERM U42, Rue Jules Guesde, Domaine du Certia, Villeneuve d'Ascq, Lille,

France.

Footnotes:

Correspondence address: Dr. A. OUAISSI, Centre d'Immunologie et de Biologie
Parasitaire, Unité INSERM 167, Institut Pasteur, 59019, Lille, France.

SUMMARY

In the present study we have used antibodies to *Leishmania major* promastigote antigens which were eluted from a glutathione-agarose column (LmGbp) and could identify several parasite components among different *Leishmania* species by using immunoprecipitation and Western blot techniques. The results also showed that some of LmGbp are present among the molecules released into the culture medium. Moreover, immunofluorescence assays clearly demonstrated that LmGbp are expressed by intracellular amastigotes. The electron micrographs of thawed cryosections of *L. major* infected cells revealed that the antigens were associated with the membrane of the phagocytic vacuole. Moreover, the Western blot technique allowed us to identify, using other *Leishmania* species extracts and anti-LmGbp antibodies, a major polypeptide of an apparent molecular mass of 66 kDa. Immunofluorescence studies suggested that the 66 kDa polypeptide is associated with intracytoplasmic vesicles. Moreover, cryosections of *Leishmania* promastigotes improved the fine structure preservation of the organelles and enables a number of features to be seen, particularly, the structures considered as vesicles, appeared as a complex tubulo-vesicular structures that resemble mammalian cell endosomes and *Leishmania* organelles previously named “megosomes”. Further studies using antibodies against the native 66 kDa protein will be needed to investigate the localization of the protein at the ultrastructural level and to follow its intracellular vesicular traffic.

Key words: *Leishmania*, immunofluorescence, immunolocalization, endosomal-like structure.

INTRODUCTION

Leishmania are kinetoplastid protozoan parasites transmitted by a blood feeding dipteran vector of the sub-family phlebotominae. Within the insect vector, the parasite replicates as noninfective promastigote which transforms into infective metacyclic promastigote. In the mammalian host, the infective promastigotes invade the macrophages and differentiate into amastigotes which are the proliferative forms within the vertebrate hosts. Much recent work has focused on the metacyclogenesis process (morphological transformation of non infective promastigotes to infective metacyclic promastigotes) since it represents a crucial step in the developmental cycle of the parasite (see review by Sacks, 1989). Indeed, studies have shown that these morphological changes are associated with increased expression of molecules which promote the virulence and survival of this parasite within the mammalian host (Kweider *et al.* 1987 ; Russel & Alexander, 1988). The striking modifications concerned the parasite surface protease Gp63 (Medina-Acosta *et al.*1989 ; Frommel *et al.*1990) and the lipophosphoglycan (LPG) (Sacks & Da Silva, 1987 ; Sacks *et al.* 1990). Moreover, studies on basic cellular function of these organisms led to the identification of several membrane proteins and enzymes which are essential for the parasite survival in its hosts (Schneider *et al.*1993). Some of these membrane enzymes play a role in the degradation of nutrients which could be taken as simplified components from the external milieu. Another important mechanism by which particule and soluble substances enter the organisms is the endocytic pathway. Indeed the flagellar pocket represents a specialized domain where endo- and exocytose take place.

Nevertheless, the lack of suitable immunochemical or cytochemical markers has made the identification of the biochemical events that occur during intracellular trafic of macromolecules difficult. Using antibodies against *L. major* promastigote antigens eluted from a glutathione-agarose column, we could identify parasite polypeptide (s) associated with complex tubulo-vesicular structures that resemble mammalian cell endosomes (Gruenberg, Griffiths & Howell, 1989 ; Griffiths, Flack & Marsh, 1989) and *Leishmania*

organelles previously termed as “megosomes” (Alexander & Vickerman, 1975). Moreover, the results obtained using immunofluorescence assays and eluted antibodies from nitrocellulose filters containing a parasite component of molecular mass of 66 kDa expressed by all the parasite strains so far examined (e.g. *L. major*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*), suggested that the protein is associated with intracytoplasmic vesicles. Rodhamine labelled BSA was internalized at 28°C and appeared to enter intracellular “organelles” which resemble the vesicles defined by antibodies against the 66 kDa parasite polypeptide. These observations suggest that this protein could be of interest to follow the parasite intracellular vesicular traffic.

MATERIALS AND METHODS

Parasite strains and culture

Promastigotes from *L. major* (clone LEM 265), *L. infantum* (ITMPA K263 strain from Morocco), *L. braziliensis* (MHO/BR/00/LV65), *L. mexicana* (MNYC) and *L. m. amazoniensis* were cultured at 26°C in GLSH monophasic liquid medium (Le Ray *et al.* 1973) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated foetal calf serum.

Preparation of *Leishmania major* glutathione-binding proteins (LmGbp)

This was performed as reported elsewhere (Plumas-Marty *et al.* 1992). Briefly, promastigotes were sonicated in an equilibration buffer 10 mM potassium phosphate, pH 7.0, containing 1 mM (EDTA), 1.5% KCl (w/v) and 0.5 mM phenylmethyl sulphonyl fluoride (PMSF). After centrifugation at 10000 rpm for 30 min in a Sorvall HB-4 rotor, the supernatant was loaded over two successive columns : first 10 ml of an agarose column, and second a glutathione-bound agarose column (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). After several washes with equilibration buffer, bound proteins were eluted by 20 ml of 50 mM Tris buffer, pH 9.1, containing 0.1 mM dithiothreitol (DTT) and 7 mM reduced glutathione (Simons & Vander Jagt, 1981). Eluates were dialysed against 10 mM potassium phosphate and concentrated on Aquacide II (Calbiochem Co., La Jolla, CA, USA). Protein concentration was determined according to the method of Lowry *et al.* (1951). After fractionation of 6µg proteins on SDS-PAGE (Laemmli, 1970) in the presence of β-mercaptoethanol, proteins were revealed by the silver staining method (Morrissey, 1981). The glutathione S-transferase activity of LmGbp (15-25 ug) was measured as described in previous report (Plumas-Marty *et al.* 1992).

Polyclonal antisera

Mouse anti-LmGbp antisera were obtained from 6-week-old male BALB/c mice by intraperitoneal injection of 25 µg of purified LmGbp in the presence of 75 µl of adjuvant

(Vaxicoq, Institut Mérieux, France: 4 u.i. of *Bordetella pertussis* (Bp) and 1.25 mg of aluminium hydroxide)/500 µl of physiological saline. Two weeks later they were boosted in the same way and bled every week. Control sera were obtained from mice injected with Bp alone. Sera from resistant (C57BL) and sensitive (BALB/c) mice infected with *L. major* promastigotes were kindly provided by Dr. G. MILON (Pasteur Institute, Paris, France).

Affinity purification of antibodies against the 66 kDa protein was performed as follows: *Leishmania major* promastigote antigens were first subjected to SDS-PAGE gels and transferred onto nitrocellulose filters. A control strip was revealed using anti-LmGbp immune serum and a peroxidase-labelled anti-mouse immunoglobulins. This allowed us to localize the 66 kDa component. The region containing the latter polypeptide was excised from the remaining nitrocellulose filter and incubated with anti-LmGbp serum, bound antibodies were then eluted following the procedure of Olmsted (1981)

Immunoblotting analysis

NP-40 promastigote extracts (20 µg/test) (from different parasite strains) or purified LmGbp (5 µg/test) were fractionated by SDS-PAGE, electro-blotted onto nitrocellulose (Towbin, Staehelin & Gordon, 1979), and then incubated with anti-LmGbp immune or control serum. Antigens were detected with specific peroxidase-labelled anti-mouse IgG (Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France).

(³⁵S) methionine labelling of *L. major* antigens

Parasite antigens were labelled with (³⁵S) methionine as described elsewhere (Ouaisi *et al.*, 1990). Pulse-chase experiments using methionine labelled promastigotes were performed as follows: different aliquots of labelled promastigotes (2x10⁶) were incubated in 5 ml of RPMI 1640 containing 10% heat-inactivated foetal calf serum, penicillin and streptomycin at 37°C during 3 and 18 h. The supernatant fraction (ES, excretory-secretory products) and the pellet of each sample were recovered. The pellets were lysed with 0.2 ml

of 10 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 1% NP-40, 100 kiu aprotinin /ml and 2 mM PMSF, and promastigote lysates (PL) were obtained after centrifugation at 7000 g for 15 min at 4°C. All supernatant fractions were sterilized by Millipore filtration (Swinnex 0.22 µm).

Immunoprecipitation experiments

This was carried out following the procedure described in a previous report (Ouaissi *et al.* 1990). Briefly, aliquots of labelled parasite antigens (5×10^5 cpm) of PL or ES products respectively were diluted with 500 µl of 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 100 kiu aprotinin / ml, 2 mM PMSF and 0.3 % sodium dodecyl sulfate (SDS), and incubated overnight at 4°C with 20 µl of immune serum or control mouse serum. Immune complexes were adsorbed with 10 mg (dry weight) of Protein A-Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Sweden) by rocking overnight at 4°C. Adsorbed antigens were eluted by suspending washed Sepharose pellets in 40 µl of 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 3% SDS, 10 % glycerol and 0.1 mM DTT and boiling for 4 min before electrophoretic separation by SDS-PAGE.

Immunofluorescence assay (IFA)

Binding assays were performed by IFA using methanol-fixed parasites or *in vitro*-infected macrophage cell line J774 as described in previous reports (Ouaissi *et al.* 1990, Ouaissi *et al.* 1991). Briefly, slides were treated as follows: (a) anti-LmGbp immune serum diluted 1/40 in phosphate buffer saline (PBS: 10 mM sodium phosphate, pH 7.2, 0.15 M NaCl) for 30 min at room temperature; (b) fluorescein-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France) diluted 1/100 in PBS for 30 min followed by three washes in PBS. Control tests were done using anti-Bp immune serum. Slides were counter stained with 0.01 % (v/v) Evans blue in PBS and mounted in glycerol-PBS solution (1:1).

Incorporation of rhodamine-labelled bovine serum albumin (rho-BSA)

We used rho-BSA as tracer to follow its localization after ingestion by the parasite. Promastigotes were washed in PBS, and then incubated for periods varying from 15 to 24 h in RPMI 1640 containing rho-BSA (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) at a concentration of 1mg/ml. After incubation the cells were washed and fixed in 0.1 % glutaraldehyde in Hanks Wallace. After several washes in HW, the parasites were examined under a fluorescent microscope.

Immunoelectron microscopy

The immunoelectron microscopy was performed according to Webster & Fish (1989). with minor modifications. Briefly, *Leishmania* promastigotes were fixed 30 min at room temperature then 1 h at 4° C in PIPES buffer 0.2 M containing 0.05% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde. They were then centrifuged and resuspended in phosphate buffer 0.2 M pH 7.4 containing 10% foetal calf serum (PBS-FCS). Parasites were centrifuged and the pellet transferred to solution of 2.3 M sucrose, 20% PVP in phosphate buffer 0.1 M pH 7.4 and incubated overnight at 4°C. They were then mounted onto metal specimen holders, frozen by immersion in liquid nitrogen and sectioned at -100°C with an ultramicrotome with cryoattachment (Reichert-Jung, Vienna/ Austria). For the immunodetection, thawed cryosections mounted on formvar-coated grids, were incubated with the following reagents : (a) mouse immune serum to LmGbp diluted 1/50 in PBS-FCS for 30 min at room temperature followed by three washes in PBS; (b) rabbit anti-mouse immunoglobulins (Miles) diluted 1/500 in PBS-FCS for 30 min at room temperature and then three washes in PBS; (c) colloidal gold coupled to protein A (PAG, 5 nm) for 30 min at room temperature and then three washes in PBS followed by two washes in distilled water. Grids were finally dried in presence of methyl cellulose and uranyl acetate. Infected cells were fixed and treated as above.

RESULTS

Isolation of *Leishmania major* glutathione-binding proteins (LmGbp)

The affinity chromatography on glutathione-agarose matrix has been widely used to isolate glutathione *S*-transferases from different parasite extracts (Simons & Vander Jagt, 1981). We have recently applied the same procedure in the case of *T. cruzi* (Plumas-Marty *et al.* 1992). Some of the isolated parasite proteins have been already sequenced in our laboratory (Plumas-Marty *et al.* 1993). We thought it was interesting to look for the presence of parasite glutathione (GSH)-binding proteins in the case of *Leishmania* parasites.

SDS-PAGE analysis and silver staining of the eluted material from GSH columns allowed the identification of two major components with molecular mass of 32, and 66 kDa (Fig 1). No GST activity could be detected using DCNB as substrate.

Characterization of LmGbp by immunoblotting analysis

Mouse immune sera to LmGbp were then tested in Western blot against *Leishmania major* promastigote total extracts. As shown in Fig.2, lane B the antibodies revealed reactive bands of 32, 37, 50, 66, 90, and 120 kDa. The presence of additional reactive bands was an unexpected finding since we never observed components of similar molecular mass after silver staining of SDS-PAGE gels containing the LmGbp.

We further explored the reactivity of anti-LmGbp immune serum against other *Leishmania* species. As shown in Fig. 3, Western blots of parasite total extracts (*L. donovani infantum* (A), *L. mexicana mexicana* (B), *L. braziliensis braziliensis* (C), and *L. mexicana amazoniensis*, D) reacted with antibodies to LmGbp revealing different band patterns. The most prominent polypeptide was the 66 kDa component.

Immunoprecipitation of (^{35}S) methionine-labelled parasite antigens by anti-LmGbp antibodies.

SDS-PAGE and fluorography of (^{35}S) methionine-labelled promastigote antigens revealed a large number of labelled proteins (Fig. 4, A). In contrast, analysis of anti-LmGbp immunoprecipitated products produced much simpler patterns with limited of components (Fig. 4, B and C). In the promastigote lysates, major bands with molecular mass of 32, 37, 50, 66-78 and 120 kDa, were detected after 3 h of labelling (Fig. 4 : lane B -a). Pulse-chase experiments showed major bands of 32, 50, 66-75, and 120 kDa after 3 h and 18 h of incubation (Fig. 4 : lanes B -d and B -g). The 37 kDa was not detected, it might represent a precursor of the 32 or 50 kDa proteins. In the supernatant fractions, anti-LmGbp immunoprecipitated material containing major polypeptides of molecular mass of : 50, 66-75, and 120-130 kDa. In contrast to the parasite pellet, the supernatant contained increasing amount of 66-75 kDa complex after different times of pulse-chase (Fig. 4, C: lanes a, b and c).

Immunofluorescence localization of LmGbp

Complementary experiments were done using indirect immunofluorescence technique. As shown in Fig. 5A, anti-LmGbp immune serum reacted against *L.major* promastigote surface and internal structures. Strong positive reaction could be detected on intracellular amastigotes (Fig. 5 G). Interestingly, positive signals were seen in association with aggregates present inside the macrophage cytoplasm in agreement with the above data showing the release of LmGbp molecules from viable parasites (Fig. 5H). Negative fluorescence was seen against *Leishmania* parasites when using anti-Bp immune serum (Fig. 5J).

The localization of the reactive antigens in preparation of *Leishmania* promastigotes from different species was also investigated using indirect immunofluorescence technique. As shown in Fig.5, there was a variation between *L. major* and other species in term of immunolocalization of LmGbp cross-reactive antigens. Two type of patterns could be

distinguished: 1) reactive material associated with the parasite surface and intracytoplasmic material (A); 2) intracytoplasmic vesicles (B, C, D, E). The most reactive material was associated with vesicles.

BSA-rhodamine labelled organelles

Labelled BSA was used as marker to identify organelles involved in fluid-phase endocytosis. *Leishmania* promastigotes were incubated with BSA-rhodamine at 37°C for 16h, washed, fixed and examined under fluorescence illumination. As shown in Fig. 5, only few *Leishmania* parasites incubated in BSA-rhodamine contained the fluorescent marker (Fig. 5F). Moreover, the majority of parasites examined showed a shape resembling that of amastigotes. The endocytosed labelled marker was found in association with vesicles resembling those detected with anti-LmGbp antibodies (Fig. 5B, C, D and E). Control experiments using excess of unlabelled BSA were negative (data not shown).

Reactivity of affinity purified antibodies to the 66 kDa protein

The above observations and the fact that anti-LmGbp antibodies were highly reactive against the 66 kDa protein prompted us to use the affinity purification of antibodies from nitrocellulose strips in order to investigate more accurately the localization of the 66 kDa component. The eluted antibodies when reacted in IFA against promastigotes showed that the 66 kDa component is associated with intracytoplasmic vesicles (Fig. 5I).

Immunoelectron microscopy study of LmGbp localization on cryosections of *L. major* promastigotes

Another approach to this study involved immunodetection of LmGbp antigens on cryosections of *L. major* promastigotes. As shown in Fig. 6, the antibodies reacted against the parasite surface and internal structures. Significantly, the gold particles of LmGbp determinants were localized predominantly to multivesicular structures morphologically

similar to the mammalian endosomes (Fig. 6B and C). The gold was also seen between the two membranes of a cisternae and in the periphery of the structure (Fig. 7 A).

The release of LmGbp was also examined by electron microscopy. As shown in Fig. 7B, the gold particles were found in association with the parasitophorus vacuole. Some label was also seen inside the host cell cytoplasm.

Affinity purified antibodies from nitrocellulose strips containing the 66 kDa polypeptide failed to react against cryosections of *L. major* promastigotes. The simplest interpretation of the discrepancy between these results and those obtained using IFA could be that the eluted antibodies may have a lower affinity for the reactive epitope possibly due to the nature of the fixative solution used: a mixture of glutaraldehyde and paraformaldehyde for immunoelectron microscopy technique whereas methanol was used in the case of IFA. Further studies using antibodies against the native 66 kDa protein will have to investigate the localization of the 66 kDa protein at the ultrastructural level.

DISCUSSION

In the present study, we have isolated *L. major* promastigote proteins termed LmGbp which bound glutathione-agarose column (32, 68). The absence of GST activity in LmGbp is not yet understood. It might be that the LmGbp were not significantly active with 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB), the substrate most often used in the assay of GSTs. Indeed, the lack of enzymatic activity when using CDNB as substrate has been reported in the case of rat liver multifunctional protein (Blocki *et al.*, 1992). These authors have shown that the enzymatic activity of the isolated protein could be detected using 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy) propane.

By using Western blot and immunoprecipitation techniques with anti-LmGbp antibodies, we have defined additional components of molecular mass of 40, 52, 110 kDa. The simplest interpretation of these data could be the following: 1) a low amount of highly immunogenic components (not detected after silver staining of the SDS-PAGE gels) were co-eluted with LmGbp and induced a strong antibody response, 2) the reactive components might share some common epitopes with the 30 and 66 kDa polypeptides. Similar observations have been made in the case of *T. cruzi* glutathione-binding proteins (TcGBP) (Plumas-Marty *et al.* 1992). Indeed, anti-TcGBP antibodies reacted against major polypeptides of molecular mass of 45, 30 and 25 kDa comprising TcGBP and additional band of 70 kDa. Moreover, sequencing of cDNA clones corresponding to the 30 and 25 kDa antigens showed that both protein sequences share 40% identity and that antibodies against either fusion peptides (30 or 25) reacted with both native proteins of 30 and 25 kDa (Plumas-Marty *et al.* 1993). These observations are, therefore, in agreement with our second hypothesis.

Our results also showed that some of LmGbp are present among the molecules released into tissue culture medium. The release of molecules was supported by three independent lines of evidence. First, immunoprecipitation of ³⁵S methionine labelled promastigote antigens during chase experiment using anti-LmGbp antibodies showed that the major part

of the polypeptides comprising LmGbp could be detected in the supernatant fraction. Second, immunofluorescence assay clearly demonstrated that LmGbp are expressed by intracellular amastigotes and form aggregates in the cytoplasm of infected cells. Third, the electron micrographs of thawed cryosections of *L. major* infected cells showed that the antigens were associated with the membrane of the phagocytic vacuole and localized in the cytoplasm of infected cells.

The anti-LmGbp reacted against other *Leishmania* species. The most prominent band detected on Western blot being the 66 kDa component. Immunofluorescence assay suggested that this protein could be localized in vesicular structures. Antibody selection combined with indirect immunofluorescence technique allowed us to confirm the 66 kDa polypeptide was, indeed, associated with vesicles.

Cryosections of *Leishmania* promastigotes improved the fine structure preservation of the organelles and enables a number of features to be seen. Many of the structures considered as vesicles, appeared as a complex tubulo-vesicular cisternae and often enclosed numerous membranous contents. These organelles have striking morphological similarities with the mammalian cell endosome internal structures. Significantly, the gold particle, were localized predominantly to the endosome-like structures. Detailed examination of electron micrographs showed that the label was associated with the vesicular and tubular membranes within the lumen of these organelles which stood out more clearly in cryosections. The gold could also be seen in the periphery of a cisternae. It is likely that the periphery is made up of two closely opposed membranes that are enclosing a cytosolic space.

The organelles described in the present study might correspond to the structures previously called “megosomes” (Alexander & Vickerman, 1975). Indeed, these organelles are very abundant in some *Leishmania* species (e.g. *L. mexicana mexicana*, up to 15% of the total cell volume, Coombs et al. 1986), and immunocytochemical studies have shown that cysteine proteinase and arylsulfatase were present in the “megosome” (Pupkis, Tetley & Coombs, 1986). The similarities between the structures we reported here and the

“megasomes” may suggest that some of the proteins comprising LmGbp could be a “megosome” related component (s).

The use of BSA-rhodamine as tracer, showed that the particles entered the vesicles resembling those defined by anti-LmGbp antibodies. However, BSA-rhodamine took a very long time to reach a detectable concentration and not all promastigotes from the cultures contained fluorescent marker.

Structures resembling the endosomal-like elements reported here have been described by De Souza, De Carvalho & Benchimol (1978). Indeed, these authors have shown by using classical Epon sections of *T. cruzi* epimastigotes, a number of cytoplasmic vesicles and multivesicular structures. The latter being more abundant in epimastigotes. Using horseradish peroxidase (HRP) as tracer to study ingestion of proteins by the parasite, they clearly demonstrated the localization of the tracer in the multivesicular structures. We have also identified and sequenced a *T. cruzi* epimastigote protein associated with multivesicular structures which resemble mammalian endosomes (Schöneck *et al.*, in preparation).

Another interesting observation is that the organelles described in the present study were located between the nucleus and the flagellar pocket. This resemble the localization of endocytic structures of African trypanosomes. Moreover, sorting of internalized labeled markers by African trypanosome organelles suggested some functional similarity to the mammalian cell endosomes (Webster & Fish, 1989).

To provide *in vitro* experimental systems for the study of membrane traffic in endocytosis, De Souza, De Carvalho & Benchimol (1978), have used a cell free system assay that allowed to show that macromolecules are ingested via vesicles which fuse with each other forming multivesicular structures. The observations reported in the present study, showed for the first time that in cryosections the internal organisation of the “endosome-like” structures was considerably clearer than in classical embedding techniques. On the other hand, our studies have permitted the identification of *Leishmania* molecules particularly the 66 kDa protein which is associated with intracytoplasmic vesicles. The use of monospecific antibody probe directed against the protein could be

useful to study the biochemical and functional properties of parasite intracellular compartments in order to better understand membrane trafficking in these pathogenic organisms.

LEGENDS FOR FIGURES

Fig.1. Silver-stained SDS-polyacrylamide gel containing different preparations (A, B) of *Leishmania* promastigote glutathione binding proteins.

Fig.2. SDS-PAGE and immunoblotting of *Leishmania major* promastigote antigens, revealed by normal mouse serum (A), anti-LmGbp immune serum (B) or *L. major* infected BALB/c mouse serum (C).

Fig.3. SDS-PAGE and immunoblotting of promastigote antigen preparations from different *Leishmania* species revealed by anti-LmGbp immune serum; *L. donovani* infantum (A), *L. mexicana mexicana* (B), *L. braziliensis braziliensis* (C) and *L. mexicana amazoniensis* (D).

Fig.4. SDS-PAGE analysis of the immune precipitate from (35S) methionine-labelled *L.major* promastigote lysate (PL) and excretory-secretory antigens (ES) using anti-LmGbp immune serum. The lanes represent as follows: A) PL preparation after 3h of labelling; B -a) PL preparation after 3h of labelling immunoprecipitated by anti-LmGbp immune serum; B -d and -g, PL preparations after 3 and 18h of chase experiment respectively, immunoprecipitated by anti-LmGbp immune serum; B -b, -c, -e, -f, h, and -i, PL preparations after 3h of labelling (b,c) or 3 (e,f) and 18h (h,i) of chase experiment immunoprecipitated by normal mouse serum (b,e,h) and anti-Bp mouse immune serum (c,f,i). The lanes C -a, -b and -c represent ES preparations after 3h of labelling, 3 and 18h after chase experiment respectively, immunoprecipitated by anti-LmGbp mouse immune serum.

Fig.5. Immunofluorescence studies using anti-LmGbp mouse immune serum and BSA-rhodamine. The antibodies revealed reactive material associated with the parasite surface

and intracellular structures (A, *L. major*) and intracytoplasmic vesicles (B, *L. d.infantum*; C, *L.m.mexicana*; D, *L. b.braziliensis*; E, *L. m.amazoniensis*. *Leishmania major* promastigotes were incubated with BSA-rhodamine at 37°C for 16h. Only few *Leishmania* promastigotes contained endocytosed BSA-rhodamine (F).

Strong positive reaction could be detected on intracellular *L. major* amastigotes (G), positive signals are also seen in association with aggregates present inside *L. major* infected macrophage cytoplasm (H). The antibodies against the 66 kDa component were affinity purified from nitrocellulose strips and reacted against *L. mexicana* promastigotes. The fluorescence is associated mainly with intracytoplasmic vesicles (I). Control test using anti-Bp immune serum reacted with *L. mexicana* promastigotes showed negative reaction (J). This represents a typical control immunofluorescence reaction with other *Leishmania* parasites.

Fig.6. Electron micrographs of *L. major* promastigote cryosections labelled with anti-LmGbp mouse immune serum and protein A-gold. A) The gold particles are seen on the external surface (small arrows) and the inner surface of the flagellar pocket (arrowhead). The label also occurs on vesicular structure (asterisk). B) High magnification showing the complex nature of the vesicular structure seen in A. The tubulovesicular nature of the structure is clearly evidenced in C. Nonspecific binding of protein A-gold was very low as determined by incubation with anti-Bp immune serum in place of mouse antibodies against LmGbp (D). Nucleus (N), kinetoplast (K), flagellar pocket (Fp). A, x13800; B, x 28000; C, x 31500; D, x 32000.

Fig.7. In A the gold particles are predominantly localized to the periphery of a cisternae (arrowhead). In B label occurs on the parasite surface (small arrows) and on the inner surface of the flagellar pocket (small arrowhead). Gold particles are also seen in association with the phagocytic vacuole (arrows). Some label is also evident in the host cytoplasm (arrowhead). Host cell (HC), flagellar pocket (Fp). A, x 62000; B, x 37000.

B. Yahiaoui and others

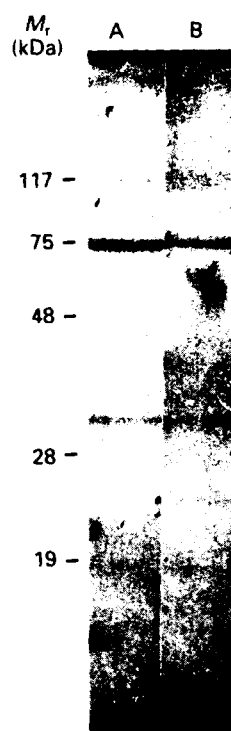


Figure n° 1

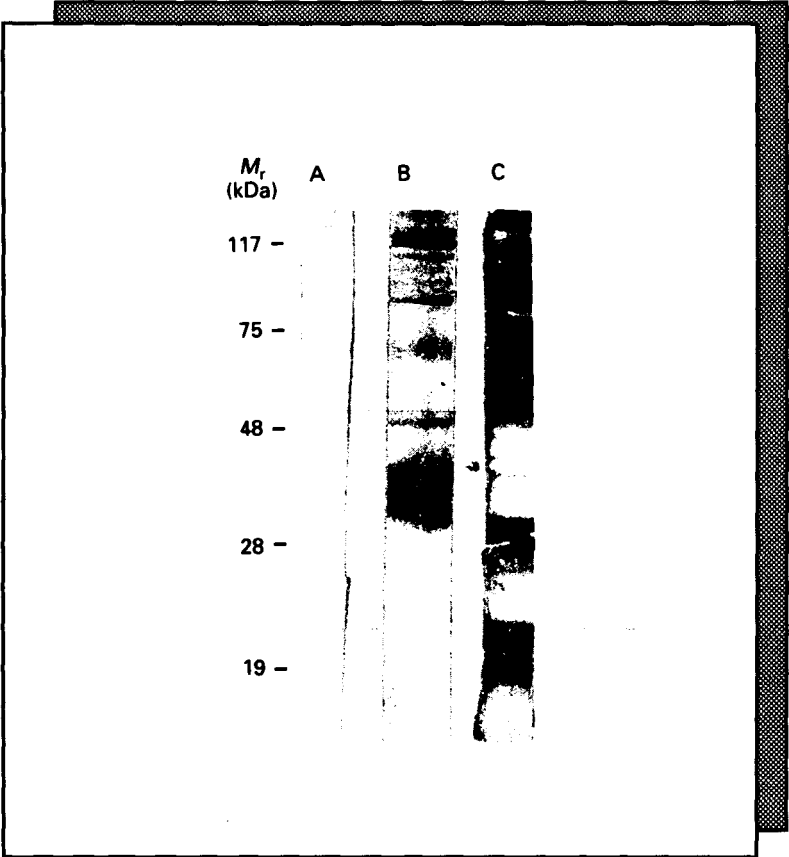


Figure n°2

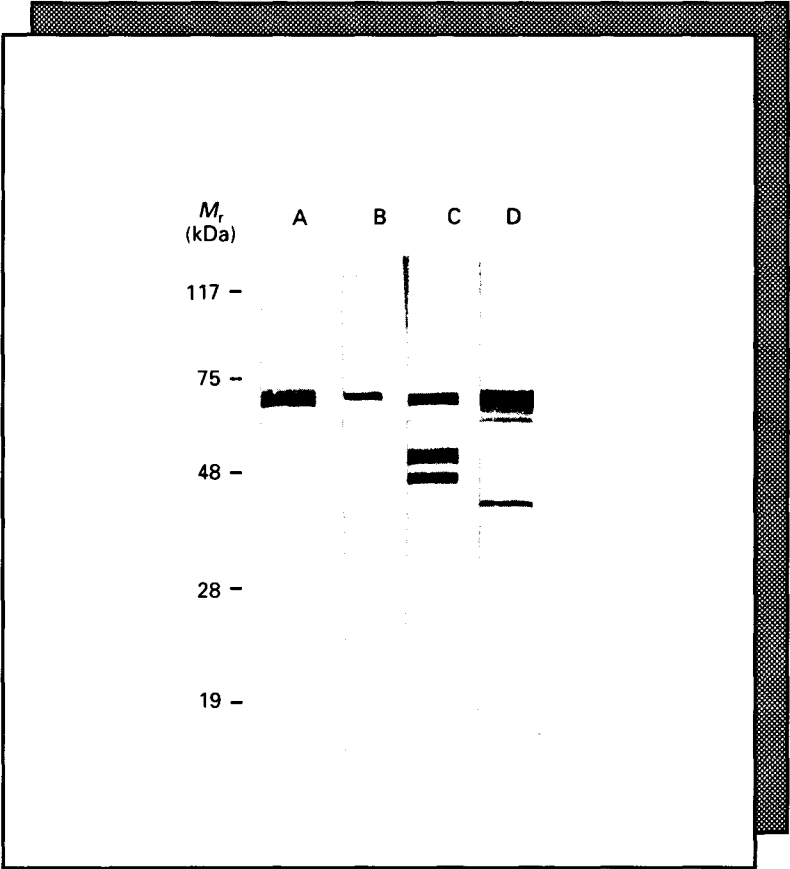


Figure nº3

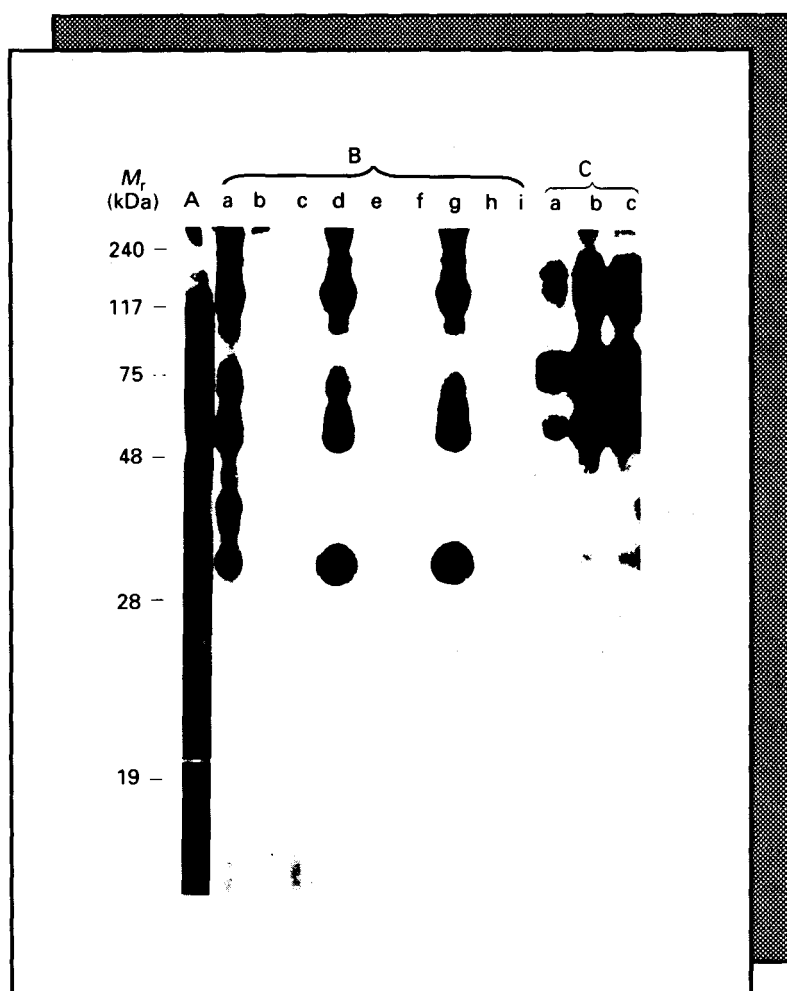


Figure n°4

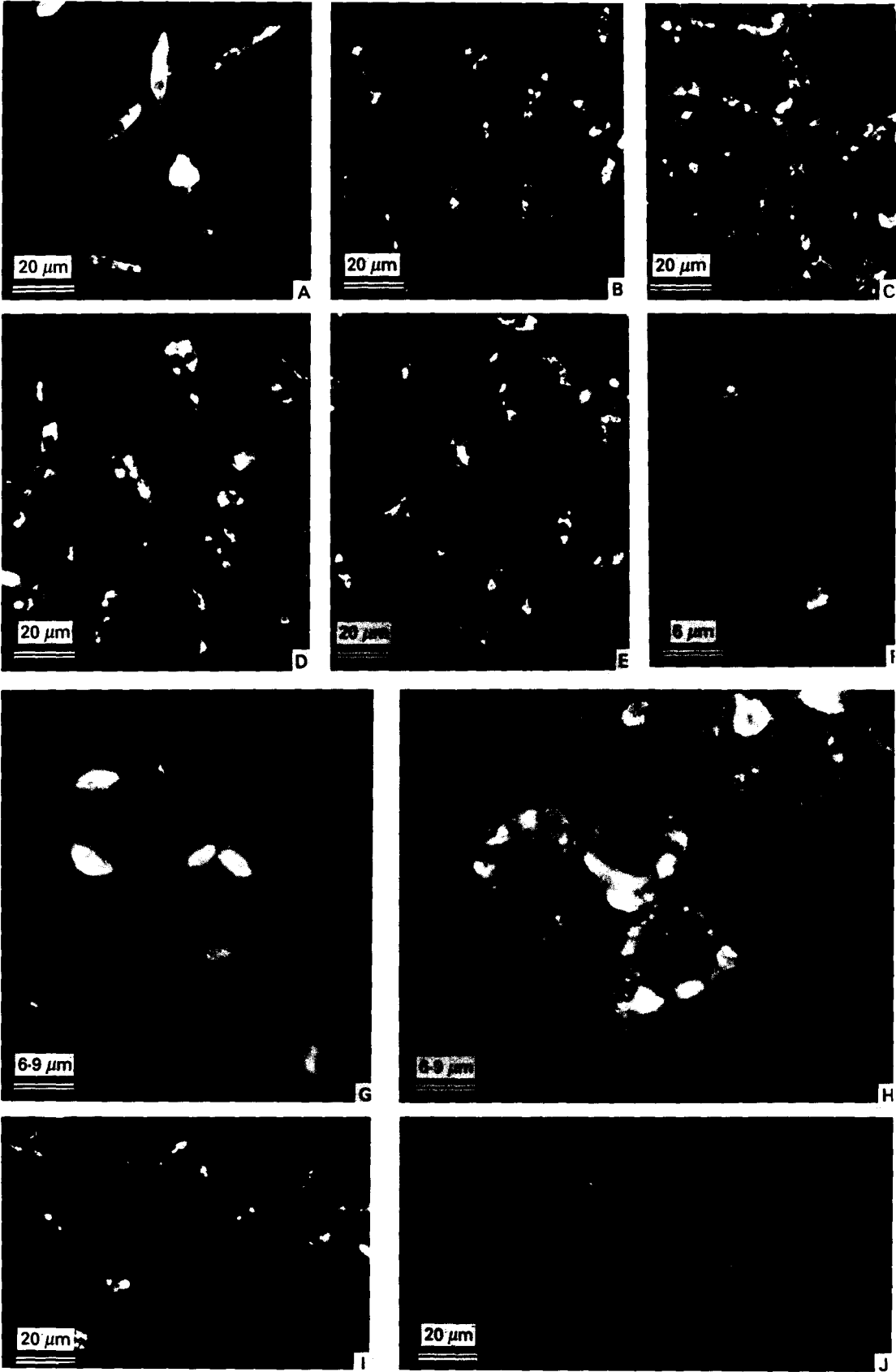


Figure n°5

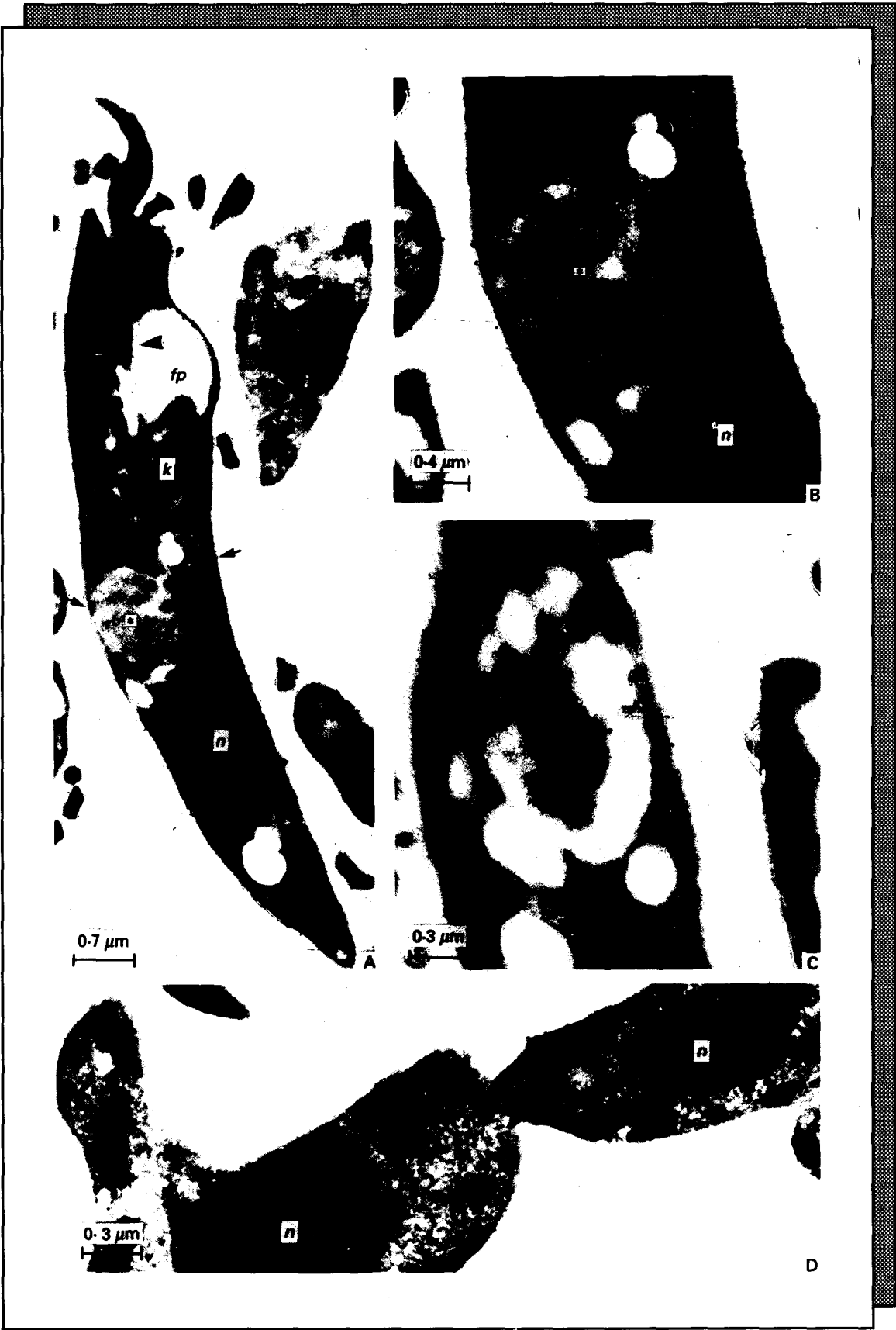


Figure n°6



A



B

Figure n°7

Aknowledgments

The authors wish to thank Pr. A. Capron for his constant encouragement and advice. This work was supported by INSERM U167 and U42. YAHIAOUI B. is a recipient of an Algerian-French co-operation fellowship.

Article n°2

Clonage et caractérisation moléculaire d'un ADNc de *Leishmania major* codant pour une protéine homologue au produit du gène SIR2 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé l'immunsérum anti-LmGbp pour cribler une banque d'expression d'ADNc de *L. major*. L'immunocriblage a permis l'isolement d'un clone ADNc (Lh) dont les principales caractéristiques ainsi que celles de la protéine correspondante (Lhp) sont les suivantes:

1- La taille de l'insert est de **1480pb**. Celui-ci révèle un cadre ouvert de **381** acides aminés, codant pour une protéine de poids moléculaire théorique de **41,96 kDa** ayant un pHI de **5,8**. L'analyse de la séquence protéique révèle un domaine potentiel de fixation à l'ADN (type doigt de zinc), se présentant sous le motif CysX2CysX20CysX2Cys. La région C-terminale de Lhp est riche en résidus serine qui constituent des sites potentiels de phosphorylation.

2- L'immunsérum anti-LmGbp montre une bonne réactivité vis-à-vis de la protéine de fusion Lhp-SJ26GST. Aucune réactivité n'a été observée sur la SJ26GST seule.

3- Lhp présente **40%** d'identité (**60%** d'homologie) avec la protéine SIR2 (**63,2 kDa**) de *S. cerevisiae*. SIR2 est impliquée chez la levure dans la régulation de la commutation du type sexuel (mating-type), et dans le maintien de l'état silencieux des gènes télomériques.

4- La production d'un sérum dirigé contre une séquence peptidique commune à LmSIR2rp et à SIR2 a permis de confirmer à la fois le cadre de lecture et l'homologie observée. En effet, l'anti-peptide révèle en Western-blot sur un extrait de promastigote une

protéine de **42 kDa** qui est également immunoprécipitée à partir des produits de traduction *in vitro* de *L. major*. De plus, l'anti-peptide réagit en Western-blot sur une protéine de **64 kDa** lorsqu'on utilise l'extrait antigénique d'une souche de *S. cerevisiae* qui surexprime le gène SIR2. Aucune réactivité n'a été observée sur les antigènes d'une souche mutante pour le gène SIR2.

5- Le Northern-blot a révélé un messager de 1,8 kb chez *L. major* et chez *L. infantum*. Le Southern-blot présente un profil d'un gène unique.

Chez les *Leishmania*, l'existence des échanges génétiques est encore de nos jours très controversée. En effet, plusieurs travaux en faveur ou contre la sexualité des *Leishmania* ont été publiés. L'identification chez les *Leishmania* d'un homologue de SIR2 qui joue un rôle important dans la sexualité de la levure, nous permet d'avoir pour la première fois un outil moléculaire pour aborder la sexualité et/ou la régulation de l'expression des gènes chez ces organismes.

Gene (1995), sous-presse

A *Leishmania major* protein with extensive homology to the silent information regulator 2 of *Saccharomyces cerevisiae*

(Immunoscreening; expression library; fusion protein; promastigote)

Bilel Yahiaoui, Ali Taibi and Ali Ouaisi

*Laboratoire de Recherche sur les Trypanosomatidae, INSERM U 415, Institut Pasteur
59019 Lille, France*

Correspondence to: Dr. M.A. Ouaisi, Laboratoire de Recherche sur les Trypanosomatidae, INSERM U 145, Institut Pasteur, 1 Rue du Pr. Calmette, 59019 Lille, France.

Tel (33-20) 87-79-67;

Fax (33-20) 87-78-88;

Abbreviations: aa, amino acid(s); Ab, antibody(ies) bp, base pair(s); cDNA, DNA complementary to RNA; cpm, counts per minute; gDNA, genomic DNA; GST, glutathione *S*-transferase; kb, kilobase(s) or 1000 bp; LhSIR2rp, *Lm* SIR2-related protein; *LhSIR2rp*, gene encoding *Lm* SIR2rp; *Lm*, *Leishmania major*; *Lm* Gbp, *Lm* glutathione-binding protein(s); nt, nucleotide(s); ORF, open reading frame; OVA, ovalbumin; PAGE, polyacrylamide-gel electrophoresis; pep, peptide; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; SDS, sodium dodecyl sulfate; SIR2, silent information regulatory 2; Sj26GST, *Schistosoma japonicum* GST; SSC, 0.15 M NaCl/0.015 M Na₃-citrate pH 7.6.

SUMMARY

We have isolated a cDNA from the protozoan parasite, *Leishmania major* (*Lm*), that encodes a protein homologous to the *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) and *Kluyveromyces marxianus* (*Km*) silent information regulator 2 (SIR2) proteins. The deduced *Lm* SIR2-related protein (termed *Lm*SIR2rp) consists of 381 amino acids (aa) residues that share 40.5% identity with yeast SIR2, increasing to 60% when substitutions are included. The calculated molecular weight of *Lm*SIR2rp (41 963 Da) differs from those of the *Sc* (63 261 Da and *Km* (74 000 Da) proteins. Indeed, the sequence of *Lm*SIR2rp lacks two stretches of aa in the N-terminal domain and the central part of the protein when compared to SIR2. Moreover, the *Lm*SIR2rp sequence contains a single potential zinc-binding domain with a CysX₂CysX₂₀CysX₂Cys motif, its C-terminal part is rich in Ser (16 Ser residues over 40 aa) which constitute potential sites for phosphorylation. Antibodies (Ab) against a synthetic peptide (pep) derived from the deduced aa sequence of *Lm*SIR2rp (aa 58 to 76, pep 58-76), when reacted against *Lm* total extract or used in the immunoprecipitation of in vitro translation products of promastigote mRNAs revealed a major band of molecular mass 42 kDa in agreement with the calculated molecular mass of the cDNA-encoded protein. Moreover, a positive reaction was obtained against a yeast strain which overproduced SIR2 (64 kDa). In contrast, a yeast strain with a *SIR2* gene disruption showed no positive signal when reacted against Ab to pep 58-76. Furthermore, a random primed cDNA hybridized with a single 1.8-kb mRNA found in both *Lm* and *L. donovani infantum* (*Ldi*) species. In addition, Southern blot analysis of genomic DNA suggested that the protein is encoded by a single gene. The characterization of a novel *Lm* gene product which shows considerable similarity to a yeast mating-type regulatory protein provides a new tool to investigate the parasite differentiation control mechanisms and gene expression regulation.

INTRODUCTION

Leishmaniasis comprises a group of diseases which are widely distributed in tropical and subtropical areas and also are commonly found in the Mediterranean basin. The extent and severity of this group of diseases designate Leishmaniasis as an important health problem. *Leishmania* are kinetoplastid protozoan parasites transmitted by a blood-feeding dipterian vector of the sub-family Phlebotominae. This parasite has a complex live cycle that includes different morphological forms. Within the insect vector, the parasite replicates as a non-infective promastigote which transforms into non-dividing but infective metacyclic promastigote. In the mammalian host, the infective promastigotes invade the macrophages and differentiate into amastigotes which are the proliferative forms within the vertebrate host. Although recent studies have begun to examine the role of protein kinases in the regulation of parasite cell cycle (Mottram et al., 1993), the basic mechanisms underlying the phenotypic transformation and the capacity to switch from non-dividing form to an intracellular replicative form within the vertebrate host macrophages are not understood at the molecular and cellular level. The lack of cell division control markers has made the identification of the molecular events that occur during the parasite cell cycle difficult. In an earlier paper we reported the characterisation of several *Leishmania major* (*Lm*) proteins (Yahiaoui et al., 1993). Here we provide sequence data suggesting that one member of this group is homologous to silent information regulatory 2 protein of *Saccharomyces cerevisiae* (Shore et al., 1984; Ivy et al., 1986). Consequently the novel parasite protein was termed, *Lm* SIR2-related protein (*LmSIR2rp*).

Mating-type in *S. cerevisiae* and related species is controlled by a pair of alleles α (*MAT* α) and *a* (*MAT* *a*) of a single locus *MAT* located on chromosome III. The determination of mating-type relies on the permanent repression of genetic information in the silent loci (*HML* α and *HMR* *a*) (Herskowitz and Oshima, 1981). Extensive studies have revealed that the four *SIR* gene products are necessary to maintain the repressed state of *HML* and *HMR* loci (Klar et al., 1979; Rine et al., 1979), but, none of them presents a DNA-

binding activity. The repression at HM loci and telomeres seems to be initiated by direct protein-protein interaction at the RAP1 (a repressor and activator of transcription) carboxyl terminus that recruit SIR3 and SIR4 to DNA (Moretti et al., 1994), and no interaction between SIR2 and RAP1-SIR3/SIR4 complex has been noted.

SIR2 has been proposed to regulate transcription and recombination in the *MAT*, *HML*, and *HMR* loci (Klar et al., 1981), as well as mitotic and meiotic recombination in ribosomal DNA which is a family of repeated genes in the yeast genome (Gottlieb and Esposito, 1993). recent work on *SIR2* and *SIR3* gene products has shown that SIR2 promotes histone deacetylation and is necessary to maintain chromatin in silent state, suggesting therefore that SIR2 is either a histone deacetylase or a histone acetyltransferase inhibitors (Braunstein et al., 1993). In this paper we present the complete aa sequence derived from a cloned cDNA of an early evolving eukaryote *L. major* , that bears structural homology to SIR2 from *S. cerevisiae* .

EXPERIMENTAL AND DISCUSSION

(a) Cloning and sequence analysis of *LmSIR2rp* cDNA

The immune serum, anti-Lm Gbp which was produced against *Lm* antigens characterized in a previous report, (Yahiaoui et al., 1993), recognized four bands with molecular weight of 43, 66, 76 and 100 kDa when reacted on Western blot against NP-40 promastigote extracts (Fig. 1). A lambda Zap II cDNA library was constructed from promastigote mRNAs using the method previously described (Ouaisi et al., 1992). The cDNA library was screened with Ab produced against *Lm* Gbp. We could isolate a positive clone (*Lh*) whose size was about 1480 bp. Computer analysis detected a single ORF of 381 aa with a theoretical molecular mass of 41 963 Da (Fig. 2). The deduced aa sequence indicated that the protein had an acidic isoelectric point at pH 5.8. This agrees well with the molecular mass of a polypeptide among those recognized in Western blot by the immune serum used for immunoscreening of the cDNA library (43 kDa). Analysis of

the aa sequence of the *Lh* gene product (Lhp) revealed a single potential zinc-binding domain (Zhang et al., 1993) with a CysX₂CysX₂₀CysX₂Cys motif (aa 152 to 178). The C-terminal part of Lhp (aa 270 to 310) is rich in Ser (16 Ser residues over 40 aa) which constitute potential sites for phosphorylation. The *LmSIR2rp* nt sequence has been deposited with GenBank (accession N^o. L40331).

(b) Production of GST-Lhp fusion protein and its recognition by anti-*Lm* Gbp serum

A Sj26GST-Lh fusion protein was expressed in *E. coli* JM109 by cloning in-frame the *Lh* cDNA into the *Eco* RI and *Xho* I sites of pGEX-4T-3 plasmid. The fusion protein was purified on glutathione-agarose beads as described (Smith and Johnson, 1988). SDS-PAGE analysis of the purified protein revealed a major band with an apparent molecular mass of 69 kDa and a minor band of 27.5 kDa corresponding to Sj26GST (Fig. 3A). Western blot analysis showed that the anti-*Lm* Gbp, the initial serum used for immunoscreening of the cDNA library reacted against the 69 kDa fusion protein but not the Sj26GST (Fig. 3B).



(c) Lhp sequence shared significant homology with yeast SIR2 proteins

The Genbank database was screened for sequences related to that of Lhp using DNASTar programs. Significant identity with *S.cerevisiae* and *K.marxianus* SIR2 proteins was observed over 238 aa residues (aa 32 to 257) (40.7 and 41%, respectively). The similarity increased to 60.5 and 57.5% when conservative aa substitutions were included. The Cys residues of the potential zinc-binding domain are conserved in the three proteins. The alignment of Lhp with the two SIR2 proteins is shown in Fig. 4.

Maximum alignment score resulted in the insertion of gaps within Lhp sequence. Based on the observed structural homology, Lhp was termed *Lm* SIR2-related protein (*LmSIR2rp*).

It is well known that the maintenance of transcriptional silencing at mating-type loci and telomeres in yeast requires the products of four genes *SIR1*, *SIR2*, *SIR3* and *SIR4*. Although, several evidences supporting the hypothesis of sexuality within the genus *Leishmania* have been reported (Le Blancq et al., 1986, Evens et al., 1987; Lanotte and Rioux, 1990; Kelly et al., 1991, Cupolum et al., 1992), genetic exchange has not yet been formally proven. However, taking into account the presence of *SIR2* homologue in *Leishmania*, it is attempting to speculate that the parasite may have evolved with gene products which might exhibit some similarities with yeast proteins. Thus, it will be interesting to search for the presence of other molecules related to the mating-type system. Moreover, the parasite cycles between vertebrate hosts and blood-feeding dipteran vector. Although, much has been reported about the expression of defined molecules which are associated with the morphological changes that occur during parasite differentiation (Kweider et al., 1987; Sacks, 1989; Medina Acosta et al., 1989; Sacks et al., 1990), specific areas which remain not understood include basic informations about key molecules which might be involved in the control of differential gene expression.

(d) The predicted ORF and the structural homology with SIR2 were supported by the immunological data obtained using Ab to a synthetic peptide derived from the *LmSIR2rp* deduced aa sequence

The use of Ab to a synthetic peptide derived from the deduced aa sequence of *LmSIR2rp* and coupled to OVA (aa 58 to 76, anti-pep 58-76-OVA) allowed the characterization of a polypeptide of an apparent molecular mass of 42 kDa among total promastigote antigens (Fig.5A, lane 2). In contrast the anti-OVA serum was negative when tested against parasite extract (lane 1).

We further explored the reactivity of anti-pep 58-76 against in vitro translation products of promastigote mRNAs. The immunoprecipitated polypeptide showed a relative mobility (42 kDa) similar to that obtained using native proteins (Fig. 6, lane 2). No reactivity was observed when using anti-OVA serum (lane 1).

Complementary investigations were conducted in order to examine the reactivity of anti-pep 58-76 against antigens of *S. cerevisiae* strain JRY2292 carrying the *SIR2* overexpressing plasmid pJR68. As shown in Fig. 5B, lane 4, a polypeptide of an apparent molecular mass of 64 kDa was identified (the deduced molecular mass of SIR2 is 63.2 kDa). In contrast, the corresponding control test using extracts from the PRET 126 strain with a *SIR2::LEU2* gene disruption showed no reactivity of anti-pep 58-76 mouse serum (Fig. 5B, lane 2). Negative reactions were observed when using anti-OVA serum (Fig. 5B, lanes 1 and 3).

Collectively, these data indicate that the cDNA identified in this study, does indeed specify a 42 kDa protein with extensive homology to SIR2 .

(e) Southern and Northern blot analysis

Southern blot analysis was performed in order to determine the copy number of *LmSIR2rp* gene, and to ascertain whether that it exists in a tandemly repeated array as is common with other trypanosomatid genes (Meade et al., 1987). As shown in Fig. 7, lanes 5, 6, and 7 *LmSIR2rp* labeled cDNA hybridized to two bands of *Hind*III, *Cla* I, and *Sal* I digested genomic DNA in agreement with the presence of one internal restriction site for these enzymes in the *LmSIR2rp* sequence. In contrast, the cDNA labeled probe hybridized to one band in the case of *Bam*HI, *Bgl* II, *Dra*I, and *Eco*RI digested gDNA (Fig. 7, lanes 1, 2, 3, and 4). Restriction sites for these enzymes were not present within the *LmSIR2rp* cDNA. This pattern of hybridization indicates that *LmSIR2rp* gene is present as a single copy.

Northern blot experiments were performed to identify the transcript homologous to the *LmSIR2rp* gene. The labeled *LmSIR2rp* cDNA hybridized with a single *L.major* mRNA of about 1.8-kb present in both total and purified mRNA preparations (Fig. 8, lanes 1 and 2). Interestingly, a transcript of similar molecular size was observed in the case of *Leishmania donovani infantum* mRNA (Fig. 8, lane 3).

(f) Conclusions

(1) The use of an anti-LmGbp immune serum allowed us to characterize a *Lm* cDNA encoding a protein with a high degree of similarity with *S. cerevisiae* and *K. marxianus* SIR2 proteins. Although these results could appear surprising, given the fact that our initial purification of *Leishmania* antigens has led to the obtention of two major components, we have shown that the immune serum directed against these proteins recognized several other parasite polypeptides. Thus, it is likely that SIR2 homologue is among the reactive antigens.

(2) Ab against a synthetic peptide derived from the predicted aa sequence of the *LmSIR2rp*, reacted against a 42 kDa polypeptide present among *Lm* antigens and the in vitro translation products of promastigote RNAs. Interestingly, anti-pep 58-76 serum reacted against a 64 kDa (SIR2), only present in the extract of *S. cerevisiae* strain carrying a *SIR2* overexpressing plasmid.

(3) The conserved potential zinc-binding domain is likely to be essential for the biological activity of *LmSIR2rp*. Such protein, with a single zinc-finger motif, have been shown to bind other peptides rather than nucleic acids (Moran and Mathews., 1987).

(4) It is likely that genetic manipulation (overexpression and disruption of *LmSIR2rp*) will contribute to determine its function which could represent an interesting lead in the field of gene expression regulation.

Fig. 1. Western blot of *Lm* promastigote antigens reacted with a rabbit immune serum raised against *Lm* Gbp (Yahiaoui et al., 1993). Lanes: **1**, pre-immune serum; **2**, anti-*Lm* Gbp rabbit serum. **Methods:** *Lm* promastigotes (clone LEM 265) were cultured at 26° C in glucose lactalbumin-serum-hemoglobin medium (GLSH) supplemented with 10% (v/v) of heat inactivated fetal calf serum (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany). Promastigotes were harvested by centrifugation at 2000 g for 10 min at 4°C and washed three times in Hank's balanced salt solution. The pellet was lysed in 0.2 ml of 10 mM Tris-HCl pH 6.8 containing 1% NP-40, 100000 I.U. aprotinin/ml and 2 mM PMSF. The promastigote lysate was centrifuged at 7000 g for 15 min at 4°C. The NP-40 soluble antigen (20µg/test) was fractionated by SDS-PAGE (Laemmli., 1970), and the Western blot was performed using standard methods (Towbin et al., 1979).

Fig. 2. The nt sequence of the *LmSIR2rp* cDNA and its deduced aa sequence. Capital letters in bold designate the Cys residues of a potential zinc-binding domain. The underlined aa sequence presents many potential phosphorylation sites. The stop codon is marked with an asterisk. Sequence data were deposited with GenBank under accession N° L40331. **Methods:** Total RNA was purified from *Lm* promastigotes using guanidium thiocyanate lysis and cesium chloride purification (Ouaissi et al., 1992). The poly(A)⁺ RNA was purified by affinity chromatography using a poly(dT) cellulose column (Pharmacia, Uppsala, Sweden). A cDNA library was prepared from poly(A)⁺ RNA using a λZAPII cDNA cloning kit and Gigapack Gold (Stratagene, La Jolla, CA) following the manufacturer's instructions. The Lh clone was isolated by immunoscreening using anti-*Lm* Gbp rabbit serum. The positive λZAPII clone was excised in vivo as a pBluescript SK plasmid by using a helper phage R 408 and *E. coli* XL-1 Blue cells (Stratagene, La Jolla, CA). The cDNA clone was sequenced on both strands by the dideoxy chain-termination method (Sanger et al., 1977) using AutoRead™ sequencing kit and Automated Laser Fluorescent DNA sequencer (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The Sequence was further

analysed by using programs purchased from LaserGene package (DNASTAR Inc., Madison, WI).

Fig. 3. Production of Sj26GST-*Lm*SIR2rp fusion protein and its reactivity with anti-*Lm* Gbp rabbit serum. (A) Coomassie-blue-stained 13% SDS-PAGE gel loaded with the Sj26GST-*Lm*SIR2rp fusion protein (left) purified on a glutathione-agarose column (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA), and molecular weight markers (right). (B) Western blot of glutathione-agarose column eluted material, reacted with pre-immune rabbit serum (lane 1), and anti-*Lm* Gbp rabbit serum (lane 2). **Methods:** The *Eco* RI-*Xho* I *Lm*SIR2rp insert from pBluescript plasmid was in-frame subcloned in the bacterial expression vector pGEX-4T-3 (Pharmacia, Uppsala, Sweden), and *E. coli* JM109 cells (Promega Co, Madison, WI, USA) were transformed using the recombinant vector DNA. Fusion protein was produced and purified as described elsewhere (Smith and Johnson., 1988).

Fig. 4. Comparison of the aa sequence of *Lm*SIR2rp (LMSIR2RP) with the *Sc* SIR2 (SCSIR2) (Shore et al., 1984; Ivy et al., 1986), and the *Km* SIR2 (KMSIR2) (GenBank accession N° S36616). Conserved Cys residues of the putative and single zinc-binding domain are indicated by asterisks. Hyphens indicate gaps. The alignment was performed using Clustal method (Higgins and Sharp., 1988) with PAM250 from LaserGene package (DNASTAR Inc., Madison, WI).

Fig. 5. Reactivity analysis of mouse immune serum to a synthetic peptide derived from the primary sequence of *Lm*SIR2rp and coupled to ovalbumin (OVA) (anti-pep 58-76-OVA). (A) Western blot of *L. major* promastigote total extract reacted with anti-OVA (lane 1), and anti-pep 58-76-OVA mouse serum (lane 2). (B) Western blot of *Sc* antigens. Lanes: 1 and 2, PRET126 strain (MATa, can1-100, his3-11, leu2-3,112, lys2Δ, trp1-1, ura3-1), with a SIR2::LEU2 disruption; 3 and 4, JRY2292 strain, (MATa, his3, trp1, ura3-52, cir0), which overproduced SIR2 and can be selected by cultivation on a medium lacking

uracyl. Both antigens were probed with anti-OVA (lanes **1** and **3**), and anti-pep 58-76 OVA mouse serum (lanes **2** and **4**). **Methods:** A synthetic peptide derived from the deduced aa sequence of *Lm*SIR2rp (aa residues 58 to 76) was conjugated to OVA and mice were immunized with the conjugated peptide or OVA alone following the procedure described elsewhere (Taïbi et al., 1993). *Lm* promastigotes (clone LEM 265) were maintained in culture as described in the legend to Fig.1. The promastigote total antigens were prepared by solubilisation and boiling the cells in SDS-PAGE sample buffer for 5 min (Laemmli, 1970). The yeast cells were cultivated at 30°C in SD synthetic medium (Sherman., 1991) lacking uracyl for JRY2292 strain and supplemented with uracyl for PRET126 strain. Yeast cells were harvested by centrifugation, washed twice with ice-cold 50mM Tris-HCl pH 8.0 . The pellet was resuspended in 5 volumes of a yeast lysis buffer 50 mM Tris.HCl pH 8.0, 0.1% Triton X-100 and 0.5% SDS. Cells were lysed mechanically by adding glass beads (0.45 to 0,50 mm in diameter) and vortexing, then the extract was recovered and clarified by centrifugation at 12000 g for 5 min at 4°C (Conrad et al., 1990; Sambrook et al., 1989). The yeast soluble antigens were fractionated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose filters and then probed with immune and normal sera (Towbin et al., 1979).

Fig.6. Fluorography of a polyacrylamide-gel containing polypeptides translated in vitro from promastigote mRNAs and immunoprecipitated with anti-OVA mouse serum (lane **1**), and anti-pep 58-76 mouse serum (lane **2**). **Methods:** *Lm* promastigote mRNA (3 µg) were translated in vitro using a rabbit reticulocyte lysate system (Promega Inc, Madison, WI) and (³⁵S) methionine (Amersham, Chicago, IL) following the manufacturer's instructions. The labeled translation products (5 x 10⁵ cpm) were incubated with anti-OVA (lane **1**) or anti-pep 58-76 mouse serum (lane **2**), and immunoprecipitation was carried out as described elsewhere (Yahiaoui et al., 1993). The immunoprecipitated products were fractionated by SDS-PAGE, the gel was treated with Amplify (Amersham, Chicago, IL), dried and exposed to X ray film (Kodak X-OMAT, Rochester, NY, USA) at -70°C.

Fig. 7. Southern blot analysis of *Lm* genomic DNA digested with different restriction enzymes and probed with *LhSIR2rp* ³²P-labeled cDNA. Lanes: **1** (*Bam*HI); **2** (*Bgl*II); **3** (*Dra*I); **4** (*Eco*RI); **5** (*Hind*III); **6** (*Cla*I); **7** (*Sal*I). **Method:** Genomic DNA was extracted as described elsewhere (Maizels et al., 1991). Aliquots (4 µg) of gDNA were digested at 37°C with different restriction enzymes (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany) for 8 hours, fractionated by electrophoresis through 0.8% agarose gel in 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA pH 8.0, denatured and transferred onto a nylon membrane (Hybond-N⁺, Amersham, UK) for 3 hours in 0.4 M NaOH (Ausubel et al., 1988). The cDNA probe was labelled with (α-³²P) dCTP by nick-translation. The blot was pre-hybridized at 42°C in 50% formamide, 5 x SSC, 25 mM Potassium Phosphate pH 7.4, 5 x Denhardt's solution and 50 µg/ml denatured salmon sperm DNA. Hybridization was performed overnight at 42°C using the pre-hybridization solution supplemented with Dextran Sulfate at 10% final concentration, and 10⁶ cpm/ml cDNA. Post-hybridization washes were performed with 2 x SSC/0.1% SDS for 5 min, then 15 min at room temperature, and in 0.1 x SSC/0.2% SDS at 42°C for 20 min. The blot was air dried and exposed to X ray film (Kodak X-OMAT, Rochester, NY, USA) at -70°C.

Fig. 8. Northern blot analysis. Northern hybridization assays were carried out using 10 µg of *Lm* promastigote total RNA (lane **1**), 2 µg of *Lm* (clone LEM 265) and *L. donovani infantum* (ITMPA k263 strain) mRNA (lane **2** and **3** respectively). **Method:** RNA was fractionated on a 1.2% agarose-formaldehyde gel (Sambrook et al., 1989), blotted onto nylon membrane and hybridized as described in legends to Fig. 7. The blot was washed twice at room temperature in 2 x SSC/0.1% SDS, then, at 42°C in 0.1 SSC/0.1% SDS for 20 min, and processed for autoradiography as described for the Southern blot.

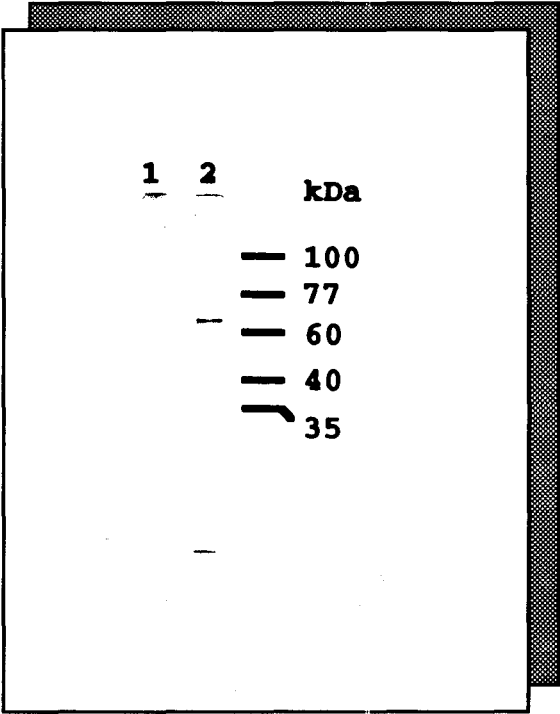


Figure n°1

GGAGGTGACGCGTCCTCCTCGCTCTTGTCTGTCTTGCCACGCGCTGCGAATCGCAATTTG	60
CTCACCGGCGGCACCTTTTAAGACTAACTTCACGTTAATTTGGATATGACAGGGTCTCCG	120
M T G S P	5
AGAGCGCCGCATCAGGAACATGCCCTCGGAGAGCCGACTGTGGAAGGGCTTGCGCGCTAC	180
R A P H Q E H A L G E P T V E G L A R Y	25
ATCAGGGAGAAGGATGTGCGGCGCATTCTCGTGCTCGTGGAGCAGGCGCCAGCGTAGCT	240
I R E K D V R R I L V L V G A G A S V A	45
GCCGGCATCCAGACTTTTCGCTCATCTGACACCGGGATCTACGCCAAGCTCGGCAAGTAC	300
A G I P D F R S S D T G I Y A K L G K Y	65
AACCTCGACGACCCGACCGATGCCTTTTCGCTGACTCTTCTGCGCGAGAAGCCAGAGATA	360
N L D D P T D A F S L T L L R E K P E I	85
TTCTACTCTATCGCACGGGAGCTGAACTTGTGGCCTGGGCACTTTTCAGCCCACCGCGGTG	420
F Y S I A R E L N L W P G H F Q P T A V	105
CATCACTTCATCCGACTGTTGCAAGACGAGGGCGCTTCTGCGCTGCTGCACGCAGAAC	480
H H F I R L L Q D E G R L L R C C T Q N	125
ATTGATGGTCTGGAGAAGGCAGCGGGCGTGTGCGCGAGCTCCTGGTTCGAGGCGCATGGG	540
I D G L E K A A G V S P E L L V E A H G	145
TCTTTTCGCTGCCGCCGCTGCATCGAATGCCACACGCCATTTCAGCATTGAGCAGAACTAC	600
S F A A A A C I E C H T P F S I E Q N Y	165
CTGGAGGCGATGAGCGGCACGGTGTCCCGCTGCTCTACATGCGGCGGCATTGTGAAGCCA	660
L E A M S G T V S R C S T C G G I V K P	185
AACGTCGTTTTCTTTGGTGAAAATTTGCCGGACGCGTTCTTCGACGCGCTGCACCACGAC	720
N V V F F G E N L P D A F F D A L H H D	205
GCCCCGATCGCGGAGCTGGTCATCATCGGACATCGATGCAGGTGCACCCGTTTCGCG	780
A P I A E L V I I I G T S M Q V H P F A	225
TTACTGCCGTGCGTGTGCCCCAAGTCCATCCCGCGCGTTCTCATGAACCGCGAGCGAGTT	840
L L P C V V P K S I P R V L M N R E R V	245
GGCGGCCTCCTCTTCCGCTTTTCTGATGACCCGCTCGACACCATCCACGACGATGCGGTT	900
G G L L F R F P D D P L D T I H D D A V	265
GCCAAGGAGGGACGCTCGTCCTCTTTCGAGAGCCGTTCCCGTCCGCGTGGCGCGGCGC	960
A K E G R S S S S Q S R S P S A S A R R	285
GAGGAGGGGGGACGGAGGACGGCTCCTCGTCGCCGAACGAGGAGGTGCAAGACGCGTCG	1020
E E G G T E D G S S S P N E E V E D A S	305
ACGTCCAGTTTCGAGTGACGGCTACGGTCAGTACGGTGACTACTACGCCCACCCCGATGTC	1080
T S S S S D G Y G Q Y G D Y Y A H P D V	325
TGCCGGGATGTTTCTTCCGCGGCGACTGCCAGGAGAAGCTGCTGAAGCTGGCCGAGTGC	1140
C R D V F F R G D C Q E N V L K L A E C	345
CTGGGCCTCAGGGAGGCGCTGGCCAAGCGATGCGCTTCTCCGGTGGCGCACCGACTACGG	1200
L G L R E A L A K R C A S P V R H Q L R	365
CACGAAAGACGTGCAATGAGACGTGAGTCTGAATTGCTGCCAACATGGTGACTGAAGAGA	1260
H E R R R M R R E S E L L P T W *	381
GTTTCATGAAGGCCGTAGGCAGAGCAGCTGAGCGCATCGAAGGCGGTCACACGCACCGCGC	1320
GTAGCCTCGCCTCGAATCATTTTCAGCGCTGTGCTTTCTTCTACGCATGATGTGTGTCGC	1380
TGCAGAAATAGGGATCGCGGTGCCCTTGCGTGTCCAACAGCAGTGCATCATGGCCGTTT	1440
CTCTCTCACCCCTCCCTACGCCCTCCGATCGCGAGCTCGAG	1480

La séquence de l'ADNc de LmSIR2rp et sa séquence déduite en acides aminés

Figure n°2

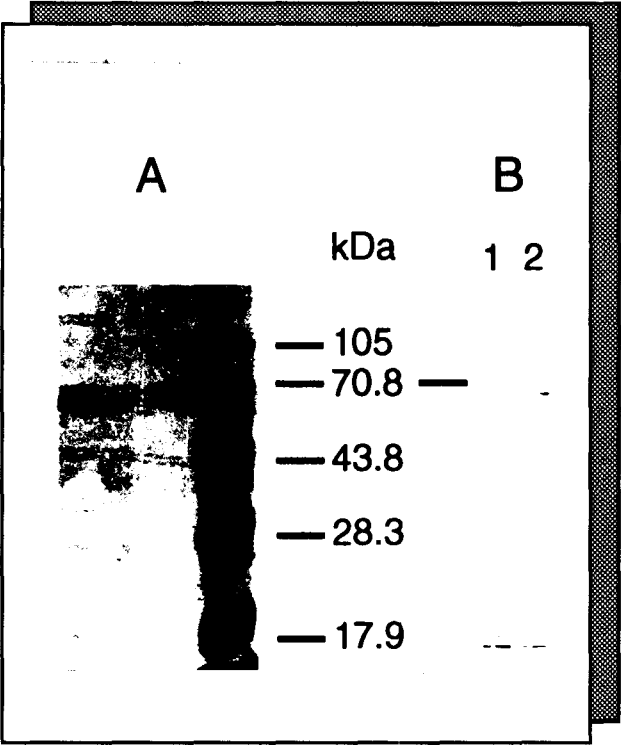


Figure n°3

Figure n°4

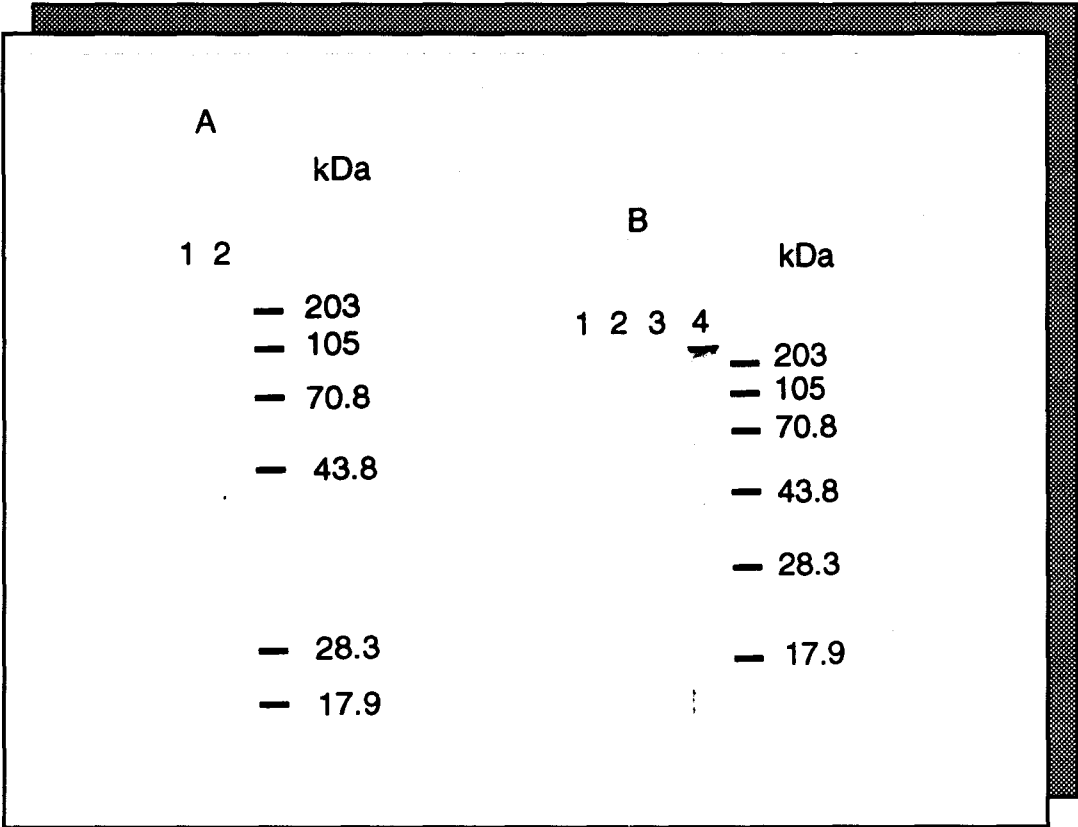


Figure nº5

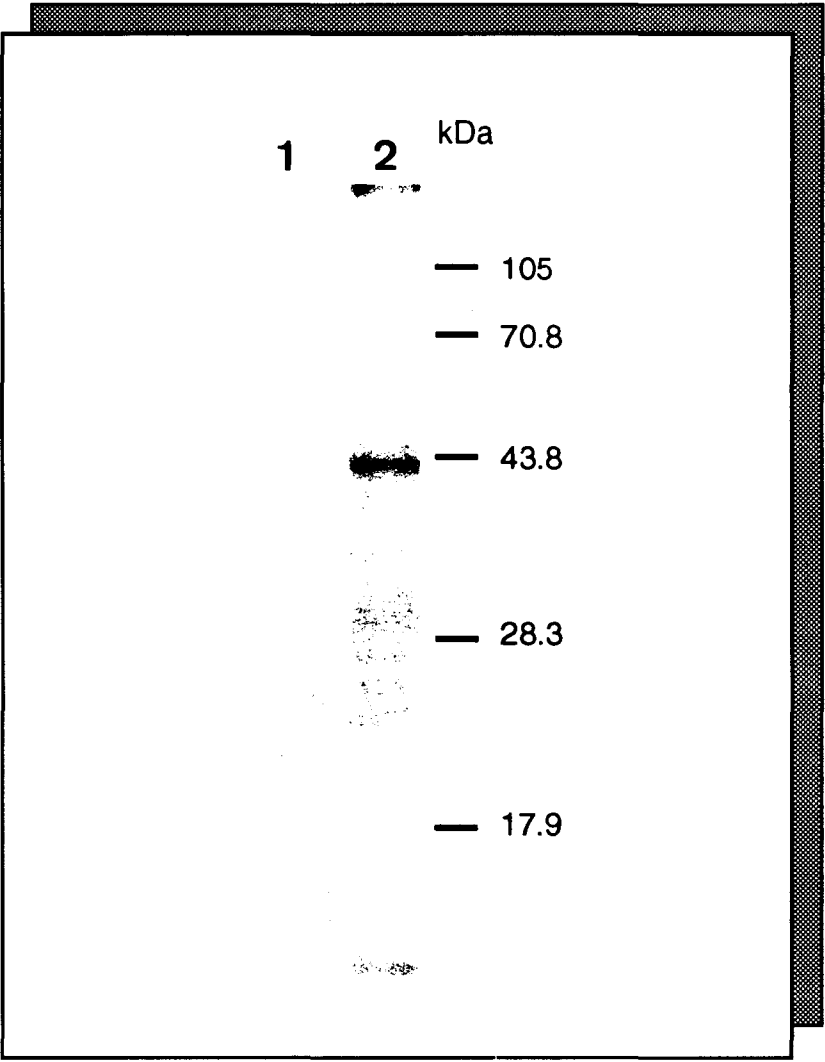


Figure n°6

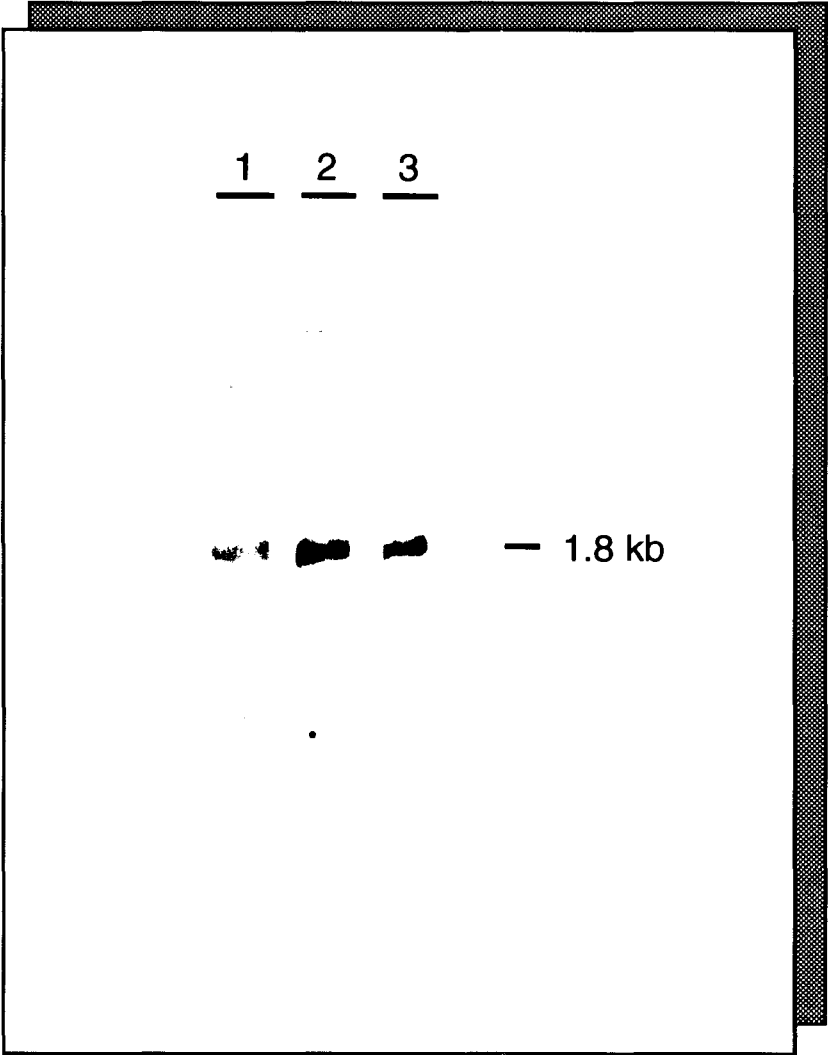


Figure n°7

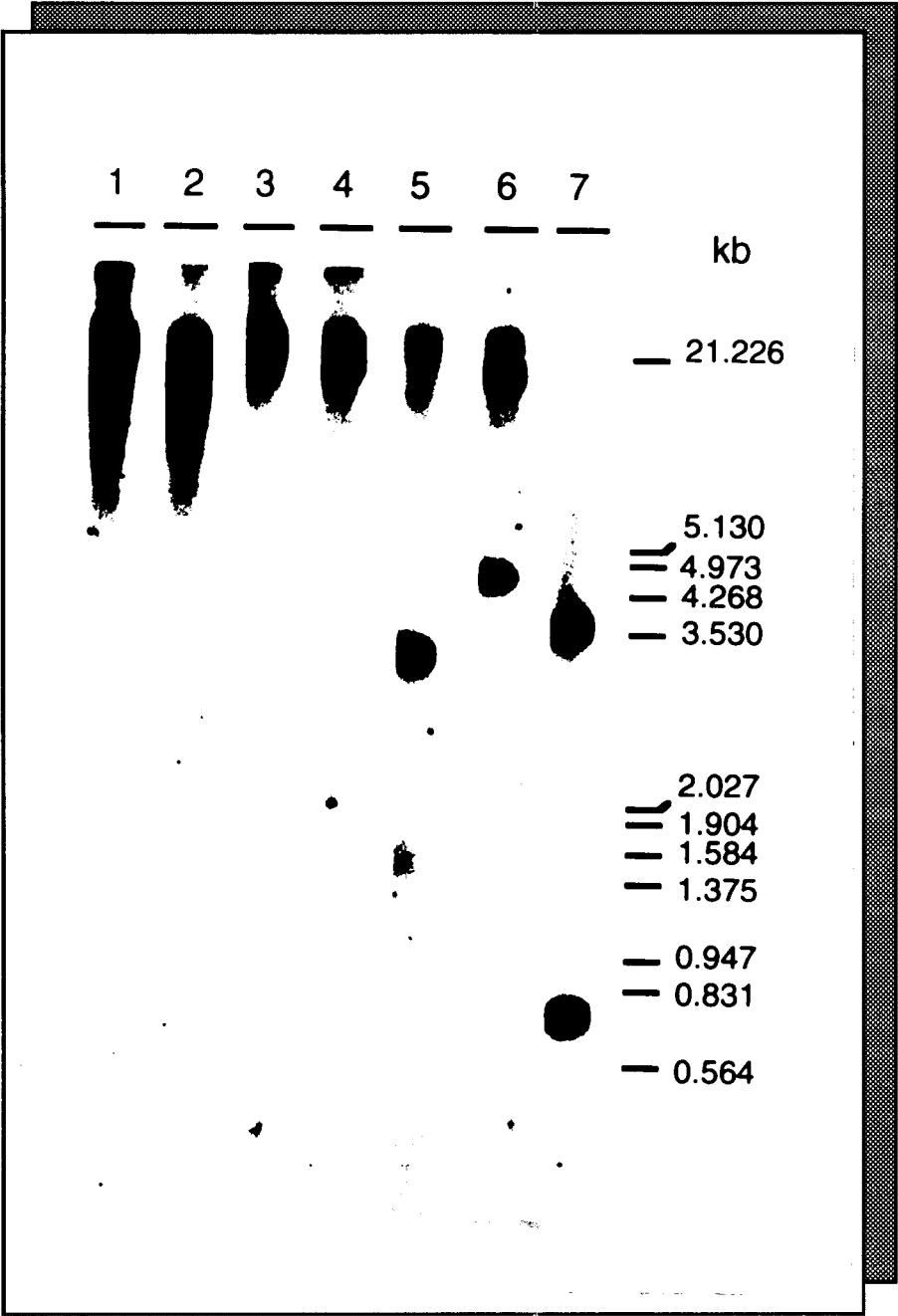


Figure n°8

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Jasper Rine at the University of California, Berkeley, for providing us with *S. cerevisiae* strains, Dr. E. Pays at the Free University of Brussels, for thoughtful advice. This work was supported by INSERM U 415. B. Yahiaoui was a recipient of a French-Algerian cooperation fellowship.

**DISCUSSION
et
PERSPECTIVES**

Les leishmanioses sont des zoonoses transmissibles à l'homme, dues à un protozoaire du genre *Leishmania*. Les leishmanies se présentent chez l'hôte vertébré sous une forme non flagellée (ou amastigote) dans les cellules du système réticulo-endothélial, et sous une forme flagellée (ou promastigote) chez l'insecte vecteur, le phlébotome.

Le réservoir du parasite est essentiellement animal. Il est représenté surtout par le chien, mais également par d'autres canidés sauvages, ainsi que les rongeurs. Dans certaines régions, l'homme peut constituer lui-même un réservoir pour le parasite, comme c'est le cas en Inde pour *L. d. donovani*.

La transmission est assurée par un phlébotome vecteur, dont la femelle, hématophage, est active toute l'année en zone intertropicale ainsi qu'à la belle saison en zone tempérée.

La leishmaniose connaît une large répartition géographique puisque l'on distingue :

Le foyer méditerranéen qui regroupe surtout les formes cutanées en Afrique du Nord et les formes viscérales en Europe du sud, notamment en France où la maladie est endémique en Corse, sur la côte d'Azur, en Provence, dans le Roussillon, les Cévennes, et sur les rives du Rhône.

Le foyer indien et extrême oriental qui comporte surtout des formes viscérales et le foyer centre-asiatique surtout des formes cutanées.

Le foyer d'Afrique tropicale regroupe des formes cutanées et viscérale.

Le foyer sud-américain où on trouve des formes cutanéomuqueuses et viscérale.

A l'heure actuelle, plusieurs questions fondamentales concernant la biologie des leishmanies et leur pathogénie restent posées. Ces aspects non éclairés portent en premier lieu sur l'organisation génétique des leishmanies, où plusieurs travaux ont fait avancer nos connaissances sur l'organisation chromosomique de ces protozoaires, cependant, deux questions fondamentales sont fortement débattues et demeurent sans réponse. La première concerne l'existence d'échanges génétiques et l'identification de stades sexuels dans une population de parents. La deuxième porte sur la ploïdie, qui reste à préciser malgré les nombreux travaux sur ce sujet.

Un autre aspect auquel s'intéresse les biologistes moléculaires actuellement, concerne la régulation de l'expression différentielle des gènes chez les leishmanies durant la différenciation adaptative. Ce mode de régulation permet aux parasites d'optimiser leur survie dans les deux environnements extrêmement différents de leur cycle évolutif. L'objectif de plusieurs équipes de recherche est d'identifier au niveau moléculaire les mécanismes qui contrôlent ces aspects de régulation et surtout les motifs *cis* régulateur (promoteurs).

Enfin, certains mécanismes de maturation des ARNm, tels que le trans-épissage et "l'édition" des transcrits des gènes mitochondriaux, semblent particuliers à ces organismes. L'étude approfondie de ces mécanismes moléculaires, a pour objet d'identifier des nouvelles cibles pour la chimiothérapie.

Chaque année, environ 400 000 nouveaux cas de leishmaniose sont déclarés de part le monde. L'O.M.S. place cette parasitose au sixième rang des plus importantes maladies tropicales. Actuellement, chez l'homme aucun vaccin anti-parasitaire (leishmanioses incluses) n'a encore vu le jour. De plus la chimiothérapie utilise des médicaments très toxiques pour les patients traités, entraînant la nécessité d'identifier de nouvelles molécules parasitaires à pouvoir vaccinant, ou pouvant constituer des cibles potentielles à des drogues. Les molécules possédant des fonctions détoxiquantes au cours du cycle parasitaire constituent de bons candidats, en particulier les enzymes impliqués dans le métabolisme du glutathion tel que les glutathion S-transférases (GST). Les arguments en faveur des GST parasitaires ont été soulignés dans la partie but du travail.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux antigènes des leishmanies, pouvant se fixer au glutathion.

Au cours de ce travail, nous avons caractérisé des antigènes de *L. major* nommés Lm Gbp ayant la capacité de se fixer au glutathion réduit. Nous avons purifié un complexe de deux protéines majeures de 33 et 66 kDa par chromatographie d'affinité sur une colonne de glutathion-agarose. L'éluat de la colonne ne présente pas d'activité GST, lorsqu'on utilise le CDNB comme substrat. Il faut noter que cette observation a déjà été faite pour d'autres

protéines telles que le MIF (facteurs inhibiteurs de migration). En effet, l'utilisation d'une colonne de S-hexylglutathion a permis la purification par affinité d'une protéine de 13 kDa à partir d'un extrait de foie de rat (Blocki et coll., 1992). Cette protéine est homologue au MIF humain et ne présente qu'une très faible homologie de séquence avec les GST, par contre, elle possède une activité enzymatique de type GST lorsque le 1,2-époxy-3-(p-nitrophenoxy) propane est utilisé comme substrat plutôt que le CDNB. Les Lm Gbp pourraient utiliser un substrat d'une autre nature, qu'il reste à identifier.

L'immunsérum anti-Lm Gbp a été produit par immunisation de souris Balb/c avec les fractions éluées de la colonne de glutathion. En plus des bandes de 33 et 66 kDa, l'anti-Lm Gbp a révélé par immunoblot et par immunoprécipitation des antigènes métaboliques, des composants supplémentaires de 40, 52, et 110 kDa. Cette réactivité peut-être expliquée soit par une communauté antigénique entre ces différentes protéines, soit par la présence en très faible quantité dans l'éluat de ces antigènes qui seraient fortement immunogènes. La première hypothèse serait la plus probable à nos yeux.

Nous avons également montré que les Lm Gbp sont libérés par les promastigotes dans le milieu de culture. Cette sécrétion a été appuyée par les résultats de trois expériences indépendantes: La première a permis de montrer l'immunoprécipitation des Lm Gbp par l'immunsérum anti-Lm Gbp à partir des composants d'excrétion/sécrétion des promastigotes marqués à la méthionine (^{35}S). La deuxième évidence a été fournie par immunofluorescence indirecte qui a permis de visualiser l'expression et la sécrétion des Lm Gbp par les amastigotes intracellulaires. En effet des agrégats ont été révélés dans le cytoplasme des cellules infectées. Enfin, la microscopie électronique a révélé un marquage de la membrane des vacuoles de phagocytose et du cytoplasme des cellules infectées.

L'analyse de la réactivité du sérum anti-Lm Gbp avec les extraits antigéniques de différentes espèces de *Leishmania* a montré l'existence d'une communauté antigénique pour ces Lm Gbp. Cependant, le polypeptide fortement immunoréactif de 66 kDa est le seul à être révélé dans tous les extraits testés. La sélection et la purification des anticorps

dirigés contre la p66 et leur utilisation en immunofluorescence indirecte a montré que la protéine de 66 kDa est localisée dans des vésicules intracytoplasmiques.

Grâce à l'utilisation combinée des anticorps anti-Lm Gbp et du complexe protéine A-or colloïdal, nous avons pu mettre en évidence en microscopie électronique, la présence des Lm Gbp dans des structures tubulo-vésiculaires intracytoplasmiques, ressemblant aux endosomes des mammifères. Le marquage par les particules d'or se retrouve au niveau du cœur des vésicules, sur la face interne de leur membrane et parfois sur l'espace périphérique de ces citernes. Il semblerait que cet espace soit délimité par deux membranes.

Les organites ici décrits pourraient être apparentés aux structures appelées "mégasomes" décrites chez les espèces du complexe *L. mexicana* (Alexander et Vickerman., 1975). Ces mégasomes représentent parfois 15% du volume intracellulaire (Coombs et coll., 1986). Par ailleurs, des études immunocytochimiques ont montré que ces larges lysosomes contiennent des cystéine protéases essentielles pour le développement du parasite (Pupkis et coll., 1986). De plus, ces enzymes sont considérées comme des cibles potentielles pour la chimiothérapie. Les similitudes entre les structures observées au cours de ce travail et "les mégasomes" laissent penser que certaines molécules du complexe Lm Gbp pourraient être apparentées aux composants des mégasomes.

Une autre observation fort intéressante a été faite au sujet de la répartition des compartiments marqués par les particules d'or. Ils paraissent localisés entre le noyau et la poche flagellaire comme ce qui a été observé pour les vésicules d'endocytose des trypanosomes Africain. De plus, le triage des molécules marquées et internalisées par les vésicules du trypanosome Africain semble similaires à celui effectué par les endosomes des cellules des mammifères (Webster et Fish., 1989).

Le transport vésiculaire est une fonction essentielle qui permet d'acheminer d'un compartiment à l'autre de la cellule eucaryote les macromolécules synthétisées (voie de biosynthèse/sécrétion) et celles provenant du milieu extracellulaire (voie d'endocytose). Le transport à travers les différents compartiments cellulaires est un processus complexe, il se décompose en trois étapes: formation d'une vésicule contenant les macromolécules par

bourgeonnement à partir du compartiment donneur, "adressage" (ou ciblage) de ces vésicules vers le compartiment accepteur et enfin la fusion avec la membrane de ce dernier. Chez les eucaryotes supérieurs, les différents compartiments du réseau des endosomes sont définis par des marqueurs spécifiques. Dans le cas des *Trypanosomatidae*, peu de marqueurs comparables sont disponibles pour entreprendre des études sur le trafic vésiculaire chez ces organismes pathogènes. Un sérum monospécifique dirigé contre le polypeptide de 66 kDa caractérisé au cours de ce travail pourrait constituer un bon outil pour ce type d'étude.

Enfin, L'expression et la sécrétion des Lm Gbp par les amastigotes renforce l'idée que ces protéines pourraient avoir un rôle direct dans les procédures de détoxification parasitaire. D'ailleurs, notre équipe a identifié et caractérisé une protéine de *T. cruzi* de 52 kDa (TcAC2) (Schöneck et coll., 1994). Cette protéine présente une homologie de séquence avec les GST et d'autres protéines de "stress", elle est exprimée et sécrétée par les stades épimastigote et amastigote et possède une affinité pour le S-hexylglutathion. D'autre part, TcAC2 a été révélée par immunocytochimie et en microscopie électronique dans des structures multivésiculaires ressemblant aux endosomes des mammifères, comme ceux observés pour les Lm Gbp.

L'ensemble de ces résultats nous ont conduit à cribler une banque d'expression d'ADNc du stade promastigote de *L. major*, à l'aide d'un sérum de lapin anti-Lm Gbp. Cet immunocriblage a permis l'isolement d'un clone nommé initialement Lhp. La séquence nucléotidique complète de Lhp a été obtenue (1480 pb), et a révélé un cadre de lecture ouvert de 381 acides aminés correspondant à une protéine de poids moléculaire théorique de 41.96 kDa. L'analyse de la réactivité en Western blot du sérum de lapin anti-Lm Gbp, sur l'extrait NP-40 de promastigotes de *L. major* a révélé un polypeptide d'environ 43 kDa. En outre, on a confirmé la spécificité du sérum anti-Lm Gbp vis à vis de la protéine Lhp en sous-clonant l'insert Lhp dans le vecteur d'expression pGEX-4T-3 qui permet d'exprimer chez *E. coli*, la protéine recombinante en fusion avec la GST de 26 kDa de *Schistosoma japonicum* (Sj26GST). La protéine de fusion Lhp-Sj26GST a pu ainsi être

purifiée sur une colonne de glutathion-agarose et utilisée en Western blot. L'immunsérum anti-Lm Gbp réagit vis-à-vis de la protéine de fusion Lhp-Sj26GST ainsi produite, mais pas vis-à-vis de la Sj26GST seule.

D'une façon intéressante, la séquence en acides aminés révèle un site potentiel unique de fixation d'un atome de zinc, se présentant sous le motif polypeptidique CysX2CysX20CysX2Cys. Ce type de motif confère à certaines protéines la propriété d'interagir spécifiquement avec l'ADN ou avec d'autres protéines. Ce motif de doigt à zinc est similaire à celui des récepteurs hormonaux nucléaires, qui à la différence de celui-ci, ils en possèdent deux exemplaires. Les VSP ("variant-specific surface proteins") de *Giardia lamblia* possèdent aussi ce type de motif qui leur confère la capacité de fixer le zinc (Nash and Mowatt., 1993; Zhang et coll., 1993). D'autre part, la région C-terminale de la protéine Lhp (270 à 310) est riche en sérine (16 Ser sur 40 acides aminés) qui pourraient constituer des sites potentiels de phosphorylation.

Afin de connaître la nature de la protéine Lhp, nous avons consulté des banques de données. Aucune homologie n'a été trouvée avec les GST ou d'autres protéines impliquées dans le métabolisme du glutathion. Toutefois, une homologie significative (de l'ordre de 60%) avec les protéines SIR2 de *S. cerevisiae* et *K. marxianus*, de poids moléculaires respectifs 63.2 et 74 kDa, a été trouvée. 40% des résidus sont strictement conservés. Compte tenu de l'homologie observée, Lhp a été rebaptisée LmSIR2rp ("*L. major* SIR2 related protein"). En outre, cette homologie de séquence a été confirmée par immunoblot. En effet, l'immunsérum dirigé contre le peptide 58-76 déduit de la séquence de LmSIR2rp et également trouvé dans SIR2, révèle un polypeptide de 64 kDa sur l'extrait total d'une souche de *S. cerevisiae* sur-exprimant le gène SIR2. Cependant, aucune réactivité de ce sérum n'a été observée sur un extrait total d'une souche de *S. cerevisiae* mutante pour ce même gène. Par ailleurs, l'anti-peptide a permis l'immunoprécipitation à partir des produits de traduction in vitro des ARNm de *L. major*, d'un polypeptide de 42 kDa. Nous confirmons par ce résultat le cadre de lecture ouvert de LmSIR2rp.

La purification d'une molécule ne possédant pas d'homologie avec les protéines du cycle du glutathion, sur une colonne de glutathion-agarose, est un cas de figure qu'on a déjà rencontré dans notre laboratoire. En effet, Béatrice Plumas-Marty a purifié trois protéines de *T. cruzi* (Tc Gbp), de 45, 30 et 25 kDa, en utilisant ce même type de colonne de glutathion-agarose (Plumas-Marty et coll., 1992). Ces trois protéines se sont avérées homologues aux facteurs d'élongation de la traduction protéique EF1 γ , β et δ . Deux des protéines de *T. cruzi* correspondants ainsi appelées TcEF1 β et TcEF1 δ , ne présentent aucune homologie de séquence avec les protéines du métabolisme du glutathion (Plumas-Marty et coll., 1994). Par contre, la séquence de la sous-unité TcEF1 γ a révélé des homologies avec les GST dans sa région N-terminale (Billaut-Mulot., 1993). Ceci peut expliquer la coélution des trois composants du complexe Tc Gbp, sachant qu'il existe des interactions protéine/protéine entre les différentes sous-unités du complexe des facteurs d'élongation. LmSIR2rp serait capable d'interagir avec d'autres protéines du complexe Lm Gbp dont l'une des composantes aurait une affinité pour le glutathion.

Les protéines SIR1, SIR2, SIR3 et SIR4 ("silent information regulatory 1-4) sont quatre protéines différentes de *S. cerevisiae*. Elles sont impliquées dans la répression de la transcription des gènes au niveau des loci *HMR* et *HML* du "mating-type" (type sexuel) et au niveau des télomères. Les protéines SIR semblent constituer une nouvelle catégorie de régulateurs de l'expression des gènes, elles exercent leur effet plus sur une région chromosomique que sur un gène isolé. Les protéines SIR interagissent avec les histones H3 et H4 et influencent la structure de la chromatine et la localisation périnucléaire des télomères. Ce contrôle régional de l'expression des gènes (qui se manifeste par une répression de la transcription) est directement relié au rôle de la structure de la chromatine dans la régulation de la transcription. En effet, l'ADN est entouré de nucléosomes qui selon leur degré de complexité peuvent empêcher ou faciliter l'accès de certains facteurs de transcription aux promoteurs.

Concernant la fonction de LmSIR2rp, il est séduisant de penser qu'elle puisse avoir un rôle dans la formation des stades sexuels chez les leishmanies, comme c'est le cas pour

SIR2 chez la levure. Il est nécessaire de rappeler qu'à l'exception de l'agent causatif du paludisme et certains sporozoaires, l'existence de types sexuels ou de gamètes chez les protozoaires parasites n'a jamais été démontrée. C'est le cas pour les *Kinetoplastida*, *Trypanosomatidae*. Ce qui est intrigant chez certains d'entre eux, c'est que cette sexualité est devenue à priori imperceptible ou totalement absente, comme si, ils avaient développé de nouveaux mécanismes de recombinaisons génétiques (Vickerman., 1994). En effet, Le Blancq et coll (1994) soulèvent le cas de *Giardia lamblia* qui est capable de remodeler son génome en absence de reproduction sexuée.

Le mode de propagation des *Trypanosomatidae* fait encore l'objet d'une grande controverse. En effet, chez ces organismes, aucun événement cytologique caractérisant la méiose ou la syngamie n'a été observé (Tait., 1983). Actuellement, il existe deux hypothèses d'école à ce sujet, l'une défend l'existence d'une reproduction sexuelle et des échanges génétiques chez les *Trypanosomatidae*, l'autre est en faveur d'une propagation clonale de ces organismes. Dans le cas des *Leishmania*, cette question a fait l'objet d'un débat scientifique éclairé, sous la forme d'un échange de lettres (Pages, Bastien et Blaineau., 1992; Tybayrenc., 1992; 1993).

Il faut noter que l'identification des mécanismes d'échanges génétiques chez ces protozoaires parasites aura des conséquences significatives sur le plan médical et taxonomique. En effet, grâce à ces mécanismes, le parasite pourrait intensifier son potentiel de variation antigénique. Le transfert de gène peut changer la pathogénie d'une souche et entraîner l'apparition de nouvelles résistances aux médicaments. Cela impliquera forcément un changement dans toutes les stratégies (vaccinale et de chimiothérapie) utilisées dans la lutte contre ces parasitoses . De même, le diagnostic spécifique d'espèce devra être réactualisé.

Par ailleurs, LmSIR2rp pourrait constituer un excellent outil moléculaire pour étudier les mécanismes de la différenciation cellulaire chez les leishmanies. Plusieurs travaux ont montré que les promastigotes et les amastigotes diffèrent par leurs caractéristiques antigéniques et enzymatiques, les changements s'opèrent lors du passage du parasite de

l'hôte vertébré à l'hôte invertébré et vice versa. Cette différence entre les deux stades du développement des leishmanies est due à une expression différentielle des gènes. En supposant que LmSIR2rp soit aussi un homologue fonctionnel de SIR2, si on associe la caractéristique de SIR2 comme régulateur régional de l'expression à la transcription polycistronique observée chez les *Trypanosomatidae*, il n'est pas exclu que la protéine LmSIR2rp puisse jouer un rôle dans la répression des gènes spécifiques du stade promastigote pour permettre l'expression de ceux du stade amastigote et inversement, favorisant ainsi la différenciation cellulaire du parasite.

Avant d'aborder le rôle biologique exact de LmSIR2rp, il serait intéressant de monter si cette protéine est phosphorylée ou non *in vivo*. Les parasites seront incubés en présence d'ortho-phosphate radioactif. Le (^{32}P) O_4 sera incorporé dans toute protéine phosphorylée. Ainsi, à l'aide du sérum anti-Lm Gbp, l'immunoprécipitation des composants parasitaires marqués au (^{32}P) permettra d'apporter un élément de réponse à cette question.

Le deuxième point concerne le motif en doigt à zinc CysX2CysX20CysX2Cys de LmSIR2rp. En effet, on peut démontrer si cette protéine fixe ou non le zinc. La méthodologie est très simple (Zhang et coll., 1993), il suffit de purifier la protéine recombinante LmSIR2rp et de l'utiliser en Western blot, tout en incluant d'autres protéines témoins (positif et négatif pour la fixation du zinc). La nitrocellulose sera ensuite incubée dans un tampon en présence de ^{65}Zn . Après plusieurs lavages, la réaction sera révélée par autoradiographie.

Le troisième point porte sur l'éventuelle fixation de LmSIR2rp à des séquences du génome de *Leishmania*. Une approche très originale a été récemment publiée (Caubin et coll., 1994). Cette méthode consiste à digérer partiellement l'ADNg des leishmanies à l'aide de l'enzyme de restriction *Sau3AI* et de liguer des adaptateurs aux extrémités des fragments de digestion. Ces adaptateurs vont servir dans l'amplification des séquences par PCR. Ensuite les fragments compris entre 250 et 750-pb seront purifiés à partir d'un gel d'agarose. Puis, ces fragments vont être incubés avec la protéine de fusion LmSIR2rp-

Sj26GST. Les complexes ADN/protéine seront immunoprécipités par un sérum anti-LmSIR2rp et la protéine A. Après plusieurs lavages avec le tampon de réaction, le 1/10 du matériel sera utilisé pour l'amplification par PCR. Le produit de la PCR subira ensuite plusieurs cycles de fixation/amplification, avant d'être sous-cloné et séquencé. Nous pouvons alors procéder ensuite à des expériences de retard sur gel.

Enfin le rôle biologique de LmSIR2rp sera abordé grâce aux techniques de la génétique moléculaire moderne, telles que la transfection sens et anti-sens ou encore la production de mutant nul par recombinaison homologue. De cette façon on pourra attribuer des phénotypes morphologiques ou physiologiques au produit du gène *LmSIR2rp*.

Cependant, l'un des meilleurs moyens pour déterminer la fonction de *LmSIR2rp* c'est de sous-cloner le gène *LmSIR2rp* dans un vecteur plasmidique de levure et d'essayer de compléter fonctionnellement des souches de *S. cerevisiae* sir2⁻ incapables de conjuguer. Mottram et coll., (1993) a utilisé sans succès le gène *cdc2rp* de *L. m. mexicana* pour compléter une souche de *S. cerevisiae* sensible à la température et mutante pour la protéine cdc2. Il semblerait qu'une homologie structurale n'implique pas forcément une homologie fonctionnelle. Par contre, Palmer et coll., (1995) ont réussi à compléter fonctionnellement une levure avec le gène *HSP90* de *T. cruzi*.

De plus, il serait intéressant de rechercher les homologues de SIR1, SIR3, SIR4 et RAP1 (composants de la machinerie de la répression chez la levure) par criblage de la banque d'expression de *L. major*.

Enfin, ce travail ouvre des perspectives certaines de la possibilité d'implication de LmSIR2rp dans la régulation de l'expression de certains gènes impliqués soit dans la différenciation parasitaire, soit dans la formation de stades sexuels chez ce protozoaire parasite.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraham, J.A., Nasmyth, K.A., and Klar, A.J.S.:** Regulation of mating-type information in yeast: negative control requiring sequences both 5' and 3' to the regulated region. *J. Mol. Biol.* 176. (1984) 307-331.
- Agami, R., Aly, R., Halman, S. and Shapira, M:** Functional analysis of *cis*-acting DNA elements required for expression of the SL RNA gene in the parastic protozoan *Leishmania amazonensis*. *Nuc. Acids. Res.* 22. (1994) 1959-1965.
- Alexander, J.:** The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv. Parasitol.* 31. (1992) 175-254.
- Alexander, J., and Vickerman, K.:** Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania* infected macrophages. *J. Parasitol.* 22. (1975) 502-508.
- Alvar, J.:** Leishmaniasis and AIDS co-infection: The spanish exemple. *Parasitol. Today.* 10. (1994) 160-163.
- Aly, R., Argman, M., Halman, S. and Shapira, M.:** A regulatory role for the 5' and 3' untranslated regions in differential expression of hsp83 in *Leishmania*. *Nuc. Acids. Res.* 22. (1994) 2922-2929
- Antony, R.L., Christensen, H.A. and Johnson, C.M.:** Micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of New World leishmaniasis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 29. (1980) 190-194.
- Aparicio, O.M., Billington, B.L., and Gottschling, D.E.:** Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell.* 66. (1991) 1279-1287.
- Arima, K., and Takano, I.:** Evidence for co-dominance of the homothallic genes, *HM α /hma α* and *HMa/hma* in *Saccharomyces yeast*. *Genetics.* 93. (1979) 1-12.
- Arrick, B.A. Griffith, O.W. and Cerami, A.:** Inhibition of glutathione synthesis as a chemotherapeutic strategy for trypanosomiasis. *J. Exp. Med.* 153. (1981) 720-725.
- Ashford, R.W., Desjeux, P. and deRaadt, P.:** Estimation of population at risk of infection and number of case of leishmaniasis. *Parasitol. Today.* 8. (1992) 104-105.

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., More, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.:** Current Protocols in Molecular Biology. Vol 1. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. 1988.
- Badaro, R., Reed, S. and Carvalho, E.M.:** Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 32. (1983) 480-484.
- Bakalara, N., Simpson, A.M. and Simpson, L.:** The *Leishmania* kinetoplast-mitochondrion contains terminal uridyltransferase and RNA ligase activities. *J. Biol. Chem.* 264. (1989) 18679-18686.
- Balloul, J.M., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J.M., Pearce, R.J., Cavallo, D., Lecocq, J.P. and Capron, A.:** Molecular cloning of a protective antigen of Schistosomes. *Nature.* 326. (1987) 149-153.
- Bastien, P., Blaineau, C. and Pages, M.:** Molecular karyotype analysis in *Leishmania*. Subcellular Biochemistry. 18. Intracellular parasites. In: Avila, J.L. and Harris, J.R. (ed.). Plenum Press, New York. NY. (1992) 131-187.
- Bastien, P., Blaineau, C., Taminh, M., Rioux, J.A., Roizes, G. and Pages, M.:** Interclonal variations in molecular karyotype in *Leishmania infantum* imply a "mosaic" strain structure. *Mol. Biochem. Parasitol.* 40. (1990) 53-62.
- Bell, S.P., and Stillman, B.:** ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature.* 357. (1992) 128-134.
- Belli, A.A., Miles, M.A. and Kelly, J.M.:** A putative *Leishmania panamensis* / *Leishmania braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Parasitol.* 109. (1994) 435-442.
- Benne, R.:** RNA editing in trypanosome mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta.* 1007. (1989) 131-139.
- Benne, R. et Van der Spek, H.:** L'édition des messages génétiques. *La Recherche.* 245. (1992) 846-854.

- Berberof, M., Vanhamme, L. and Pays, E.:** *Trypanosoma brucei*: A preferential splicing at the inverted polyadenylation site of the VSG mRNA provides further evidence for coupling between trans-splicing and polyadenylation. *Exp. Parasitol.* 80. (1995) 563-567.
- Billaut-Mulot, O., Pommier, V., Schöneck, R., Plumas-Marty, B., Taibi, A., Loyens, M, Capron, A. and Ouaiissi, M.A.:** Nucleotide sequence of *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a protein homologous to mammalian EF1 γ . *Nuc. Acids. Res.* 21. (1993) 3901.
- Blocki, F.A., Schilevert, P.M., and Wackett, L.P.:** Rat liver protein linking chemical and immunological detoxification systems. *Nature* . 360. (1992) 269-270.
- Blum, B., Bakalara, N. and Simpson, L.:** A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide RNA" molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell.* 60. (1990) 189-198.
- Blum, B. and Simpson, L.:** Formation of gRNA/mRNA chimeric molecules in vitro, the initial step of RNA editing, is dependent on an anchor sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89. (1992) 11944-11948.
- Boothroyd, J.C.:** Antigenic variation in African trypanosomes. *Annu. Rev. Microbiol.* 39. (1985) 475-501.
- Borst, P.:** Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 55. (1986) 701-732.
- Borst, P., Van der Ploeg, M., Van Hoek, J.F.M., Tas, J. and James, J.:** On the DNA content and ploidy of trypanosomes. *Mol. Bioch. Parasitol.* 6. (1982) 13-23.
- Brand, A.H., Breeden, L., Abraham, J., Sternglanz, R., and Nasmyth, K.:** Characterisation of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell.* 41. (1985) 41-48.
- Braunstein, M., Rose, A.B., Holmes, S.G., Allis, C.D. and Broach, J.R.:** Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Gene & Dev.* 7 (1993) 592-604.

- Brodin, T.N., Heath, S. and Sacks, D.L.:** Genes selectively expressed in the infectious (metacyclic) stage of *Leishmania major* promastigotes encode a potential basic-zipper structural motif. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52. (1992) 241-250.
- Brun, R., Berens, R.S. and Kressner, S.M.:** Inhibition of *Leishmania donovani* transformation by hamster spleen homogenates and active human lymphocytes. *Nature.* 262. (1976) 689-691.
- Button, L.L. and McMaster, W.R.:** Molecular cloning of the major surface antigen of *Leishmania*. *J. Exp. Med.* 167. (1988) 724-729.
- Caubin, J., Iglesias, T., Bernal, J., Munoz, A., Marquez, G., Barbero, J.L. and Zaballos, A.:** Isolation of genomic DNA fragments corresponding to genes modulated in vivo by a transcription factor. *Nuc. Acids. Res.* 20. (1994) 4132-4138.
- Cech, T.R.:** Self-splicing of group I introns. *Annu. Rev. Biochem.* 59. (1990) 543-568.
- Chang, K.P. and Chaudhuri, G.:** Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* 44. (1990) 499-529.
- Chang, K.P., Fong, D. and Bray, R.S.:** Biology of *Leishmania* and Leishmaniasis, p. 1-30. In K.P. Chang and R.S. Bray (ed.), *Leishmaniasis*. Elsevier, London. (1985).
- Chien, C.T., Buck, S., Sternglanz, R., and Shore, D.:** Targeting of SIR1 protein establishes transcriptional silencing at HM loci and telomeres in yeast. *Cell.* 75. (1993) 531-541.
- Chung, H.M., Shea, C., Fields, S., Taub, R.N., Van der Ploeg, L., and Tse, D.B.:** Architectural organization in the interphase nucleus of the protozoan *Trypanosoma brucei*: location of telomere and minichromosomes. *EMBO J.* 9. (1990) 2611-2619.
- Conrad, M.N., Wright, A.J., Wolf, A.J., and Zakian, V.A.:** RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell.* 63. (1990) 739-750.
- Coombs, G. H., Tetley, L., Moss, V. A., and Vickerman, K.:** Three dimensional structure of the *Leishmania* amastigote as revealed by computer aided reconstruction from serial section. *Parasitology* . 92. (1986) 13-23.

- Coulson, R.M. and Smith, D.F.:** Isolation of genes showing increased or unique expression in the infective promastigotes of *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 42. (1990) 63-75.
- Cupollilo, E., Grimaldi, G. Jr. and Momen, H.:** Hybrid parasites in the *Leishmania braziliensis* "complex" causing cutaneous leishmaniasis in humans. *Isozyme. Bull.* 25. (1992) 51.
- Cruz, A.K. and Beverley, S.M.:** Gene replacement in parasitic protozoa. *Nature.* 348. (1990) 171-174.
- Cruz, A.K., Titus, R. and Beverley, S.M.:** Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targetting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90. (1993). 1599-1603.
- Darce, M., Moran, J., Palacios, X., Belli, A., Gomez-Urcuyo, F., Zamora, D., Valle, S., Gantier, J.C., Momen, H. and Grimaldi, G.:** Ethiology of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85. (1991) 58-59.
- Dargouge, O.:** Les cascades du sexe chez la mouche. *La Recherche.* 20. (1989) 1530-1532.
- Da Silva, R.P., Hall, P.F., Joiner, K. and Sacks, D.L.:** CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J. Immunol.* 143. (1989) 617-622.
- Dedet, J.P.:** Les leishmanioses. *Encycl. Méd. Chir.* (Paris, France), Maladies infectieuses, 8094 A¹⁰, (1986) 8 p.
- De Lafaille, M.A.C., Laban, A. and Wirth, D.F.:** Gene expression in *Leishmania*: Analysis of essential 5' DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89. (1992) 2703-2707.
- Dengen, R., Pospichal, H., Enyaru, J. and Jenni, L.:** Sexual compatibility among *Trypanosoma brucei* isolates from an epidemic area in southeeastern Uganda. *Parasitol. Res.* 81. (1995) 253-257.
- Denis, H., et Lacroix, J.C.:** L'origine de la lignée germinale et de la mortalité cellulaire. *médecine/science.* 8. (1992) 695-702
- De Souza, W., De Carvalho, T. U., and Benchimol, M.:** *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural, cytochemical and freeze-fracture studies of protein uptake. *Exp. Parasitol.* 45. (1978) 101-115.

- Dietzel, C., and Kurjan, J.:** Pheromonal regulation and sequence of *Saccharomyces cerevisiae* *SST2* gene: a model for desensitization to pheromone. *Mol. Cell. Biol.* 7. (1987) 4169-4177.
- Diffley, J.F., and Stillmann, B.:** Transcriptional silencing and lamins. *Nature.* 342. (1989) 24.
- El Safi, S.H. and Evans, D.A.:** A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis of leishmaniasis in the Sudan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83. (1989) 334-337.
- Evans, D.A., Kennedy, W.P.K., Elbihari, S., Chapman, C.J., Smith, V. and Peters, W.:** Hybrid formation with the genus *Leishmania* ?. *Parasitologia.* 29. (1987) 165-173.
- Evans, D.A., Smith, V., Killick-Kendrick, R. Neal, R.A. and Peters, W.:** Evidence for hybrid formation in the genus *Leishmania* . In: Hart, D.T. (ed.), *Leishmaniasis: The current status and new strategies for control.* Plenum Press, New York, NY. (1989) 685.
- Feagin, J.E., Abraham, J.M. and Stuart, K.:** Extensive editing of the cytochrome c oxidase III transcript in *Trypanosoma brucei*. *Cell.* 53. (1988)
- Feagin, J.E. and Stuart, K.:** Developmental aspects of uridine addition within mitochondrial transcripts of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* 8. (1988) 1259-1265.
- Feldman, J.B., Hicks, J.B., and Broach, J.R.:** Identification of sites required for repression of a silent mating-type locus in yeast. *J. Mol. Biol.* 178. (1984) 815-834.
- Fishman-Lobell, J. et Haber, J.E.:** Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol. Cell. Biol.* 12. (1992) 1292-1303.
- Flinn, H.M. and Smith, D.F.:** Genomic organisation and expression of a differentially regulated gene family from *Leishmania major*. *Nucl. Acids. Res.* 20. (1992) 755-762.
- Foss, M., McNally, J., Laurenson, P., and Rine, J.:** Origin recognition complex (ORC) in transcriptional silencing and replication in *S. cerevisiae*. *Science.* 262. (1993) 1838-1844.
- Frommel, O. T., Button, L. L., Fujikura, Y., and McMaster, W. R.:** The major surface glycoprotein (GP63) is present in both life stages of *Leishmania*. *Mol. Bio. Parasitol.* 38. (1990) 25-32.

- Garnham, P.C.C.:** Malaria parasites and other *Haemosporidia*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. (1966).
- Giannini, S.H., Schittini, M., Keithly, J.S., Warbuton, P.W., Cantor, C.R., Van Der Ploeg, L.H.T.:** Karyotype analysis of *Leishmania* species and its use in classification and clinical diagnosis. *Science*. 232. (1986) 762-765.
- Gibson, W.C., Osinga, K.A., Michels, P.A.M. and Borst, P.:** Trypanomomes of subgenus *Trypanozoon* are diploid for housekeeping genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16. (1985) 231-242.
- Gibson, W.C. and Whittington, H.:** Genetic exchange in *Trypanosoma brucei*: Selection of hybrid trypanosomes by introduction of genes conferring drug resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* 60. (1993) 19-26.
- Gilson, E., Roberge, M., Giraldo, R., Rhodes, D., Gasser, S.M.:** Distortion of the DNA double helix by RAP1 at silencers and multiple telomeric binding sites. *J. Mol. Biol.* 231. (1993) 293-310.
- Goodnough, W.:** An essay on the origins and evolution of eukaryotic sex. In: The origin and evolution of sex. Halvorson, H.O., and Monroy, A. editions. New York: Liss. (1985) 123-140.
- Gottlieb, S., and Esposito, R.E.:** A new role for yeast transcriptional silencer gene, *SIR2*, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell*. 56 (1989) 771-776.
- Gottschling, D.E.:** Telomere-proximal DNA in *Saccharomyces cerevisiae* is refractory to methyltransferase activity *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89. (1992) 4062-4065.
- Gottschling, D.E., Aparicio, O.M., Billington, B.L., and Zakian, V.A.:** Position effect at *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: reversible repression of pol II transcription. *Cell*. 63. (1990) 751-762.
- Gradoni, L., Grammiccia, M., Maroli, M. and Pozio, E.:** Infestations mixtes de *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 par différent zymodemes du complexe *Leishmania infantum*. In: Rioux, J.A.(ed.), *Leishmania: Taxonomie et phylogénèse*. IMEEE, Montpellier, France. (1986) 305.

- Graham, S.V.:** Mechanisms of stage-regulated gene expression in *Kinetoplastida*. *Parasitol. Today*. 11. (1995) 217-223.
- Grell, K.G.:** Protozoology. Springer. Berlin. (1973).
- Griffiths, G., Back R., and Marsh, M.:** A quantitative analysis of the endocytic pathway in baby hamster kidney cells. *J. Cell . Biol.*. 109. (1989) 2703-2720.
- Gruenberg, J., Griffiths, G., and Howell, K. E.:** Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles *in vivo* and with an assay of vesicle fusion *in vitro*. *J. Cell . Biol.*. 108. (1989) 1301-1316.
- Harashima, S., and Oshima, Y.:** Mapping of the homothallic genes, *HMa* and *HM α* in *Saccharomyces* yeast. *Genetics*. 77. (1976) 437-451.
- Harith, A.E., Kolk, A.H.J., Kager, P.A., Leeuwenberg, J., Muigai, R., Kiugi, S. and Laarman, J.J.:** A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiologicla studies of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80. (1986) 583-587.
- Harris, M., Decker, C., Sollner-Webb, B. and Hajduk, S.:** Specific cleavage of pre-edited mRNAs in trypanosome mitochondrial extracts. *Mol. Cell. Biol.* 12. (1992) 2591-2598.
- Hart, D.T. and Oppendoes, F.R.:** The occurence of glycosomes (microbodies) in the promastigote stage of four major *Leishmania* species. *Mol. Biochem. parasitol.* 13. (1984) 159-172.
- Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S.M., and Grunstein, M.:** Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell*. 80. (1995) 583-592.
- Henikoff, S.:** Position-effect variegation after 60 years. *TIG*. 6. (1990) 422-426.
- Herman, D., et Collenot, A.:** L'origine et l'évolution de la reproduction sexuée. *Médecine/Sciences*. 9.(1993) 1392-1403.
- Herskowitz, I. and Oshima, Y.:** in The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*:: life cycle and inheritance. eds. Strathern, J.N., Jones, E.W. and Broach, J.R.: (Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor, NY). (1981) 181-209.

- Hicks, J.B., Strathern, J.N., and Herskowitz, I.** The cassette model of mating-type interconversion. In *DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes*. Bukhari, A., Shapiro, J., and Adhya, S. editions. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. (1977) 457-462.
- Hicks, J.B., Strathern, J.N., and Klar, A.J.S.:** Transposable mating type genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 282. (1979) 478-483.
- Higgins, D.H. and Sharp, P.M.:** Clustal: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*. 73 (1988) 237-244.
- Hochestrasser, M., Mathog, D., Gruenbaum, Y., Saumweber, H., and Sedat, J.W.:** Spatial organization of chromosomes in the salivary gland nuclei of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell. Biol.* 102. (1986) 112-123.
- Huberman, J.A., Zhu, J.G., Davies, L.R., and Newlon, C.S.:** Close association of a DNA replication origin and ARS element on chromosome III of the yeast, *Sacchharomyces cerevisiae*. *Nucleic. Acids. Res.* 16. (1988) 6373-6348.
- Iovannisci, D.M. and Beverley, S.M.:** Structural alterations of chromosome 2 in *Leishmania major* as evidence for diploidy, including spontaneous amplification of the mini-exon array. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34. (1989) 177-188.
- Iovannisci, D.M., Goebel, D., Allen, K., Kaur, K. and Ullman, K.:** Genetic analysis of adenin metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Biol. Chem.* 259. (1984) 14617-14623.
- Ivy, J.M., Hicks, J.B., and Klar, A.J.:** Map positions of yeast genes *SIR1*, *SIR3* and *SIR4*. *Genetics*. 111. (1985) 735-744.
- Ivy, J.M., Klar, A.J., and Hicks, J.B.:** Cloning and characterization of four *SIR* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 6. (1986) 688-702.
- Jenni, L., Marti, S., Schweizer, J., Betshart, B., Le Page, R.W.F., Wells, J.M., Tait, A., Paindavoine, P., Pays, E. and Steiner, M.:** Hybrid formation between african trypanosomes during cyclical transmission. *Nature*. 322. (1986) 173-175.

- Johnson, A.D., and Herskowitz, I.:** A repressor (MATa2 product) and its operator control expression of a set of cell type specific genes in yeast. *Cell*. 42. (1985) 237-247.
- Johnson, L.M., Kayne, P.S., Kahn, E.S., Grunstein, M.:** Genetic evidence for an interaction between SIR3 and histone H4 in the repression of the silent mating loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87. (1990) 6286-6290.
- Johnson, L.M., Fisher-Adams, G., and Grunstein, M.:** Identification of a non-basic domain in the histone H4 N-terminus required for repression of the yeast silent mating loci. *EMBO. J.* 11. (1992) 2201-2209.
- Kassir, Y. and Simchen, G.:** Regulation of mating and meiosis in yeast by the mating-type region. *Genetics*. 82. (1976) 187-206.
- Kasper, L. H., Crabb, J. H., and Pfefferkorn, E. F.:** Purification of major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoadsorption with monoclonal antibody. *J. Immunol.* **130**. (1983) 2407-2412.
- Kayne, P.S., Kim, U.J., Han, M., Mullen, J.R., Yoshizaki, F., and Grunstein, M.:** Extremely conserved histone H4 N-terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. *Cell*. 55. (1988) 27-39.
- Kean, B.H., Mott, K.E. and Russel, A.J.:** TROPICAL MEDICINE AND PARASITOLOGY. Classic investigations. Vol 1. Cornell University Press. Ithaca and London. (1978) 228-270.
- Kelly, J.M., Law, J.M., Chapman, C.J., Van Eys, G.J.J.M. and Evans, D.A.:** Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46. (1991) 253-264.
- Kennedy, B.K., Austiaco, N.R., Zhang, J., and Guarente, L.:** Mutation in the silencing gene *SIR4* can delay aging in *S. cerevisiae*. *Cell*. 80. (1995) 485-496.
- Killick-Kendrick, R.:** The transmission of leishmaniasis by the bite of the sandfly. *J. Roy. Army. Med. Corps*. 132. (1986) 134-140.
- Klar, A.J.S., Fogel, S. and McLeod, K.:** MAR1- A regulatory of *HM a* and *HM α* loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 93 (1979) 37-50.

- Klar, A.J.S., Hicks, J.B. and Stathern, J.N.:** Directionality of yeast mating-type interconversion. *Cell*. 28. (1982) 551-561.
- Klar, A.J.S., Strathern, J.N., Broach, J.R. and Hicks, J.B.:** Regulation of transcription in expressed and unexpressed mating type cassettes of yeast. *Nature*. 289 (1981) 239-244.
- Kweider, M., Lemesre, J. L., Darcy, F., Kusnierz, J. P., Capron, A., and Santoro, F.:** Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65,000 dalton surface antigen. *J. Immunol.* 138. (1987) 299-305.
- Laemmli, U. K.:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, London. 227. (1970) 680-685.
- Lainson, R. and Shaw, J.J.:** Observations of the development of *leishmania (L.) Chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sanfly vector *Lutzomyia longipalis* (Lutz and Neiva). *Ann. parasitol. Hum. Comp.* 63. (1988) 134-145.
- Lanfear, S.M., McMahon-Pratt, D. and Wirth, D.F.:** Tandem arrangement of tubulin genes in the protozoan parasite *Leishmania enrietti*. *Mol. Cell. Biol.* 3. (1983) 1070-1076.
- Lanotte, G. and Rioux, J.A.:** Fusion cellulaire chez les *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *C. R. Acad. Sci.* 310. (1990) 285-288.
- Laurenson, P., and Rine, J.:** Silencers, silencing, and heritable transcriptional states. *Microbiol. Rev.* 56. (1993) 543-560.
- Le Blancq, S.M.:** Chromosome rearrangements in *Giardia lamblia*. *Parasitol. Today* . 10. (1994) 177-179.
- Le Blancq, S.M., Shnur, L.F. and Peters, W.:** *Leishmania* of the old world: 1. The geographical and hostal distribution of L. major zymodemes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80. (1986) 99-112.
- LeBowitz, J.H., Smith, H., Rusche, L. and Beverley, S.M.:** Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Gene & Dev.* 7. (1993) 996-1007.

- Leon, W., Fouts, D.L. and Manning, J.:** Sequence arrangement of the 16S and 26S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellate *Leishmania donovani*. *Nuc. Acids. Res.* 5. (1978) 491-503.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr A. L., and Randall, J. R.:** Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193. (1951) 265-275.
- Maizels, R.M., Blaxter, M.L., Robertson, B.D. and Selkirk, M.E.:** Parasite Antigens, Parasite Genes. A Laboratory Manual for Molecular Parasitology. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1991.
- Maazoun, R., Lanotte, G., Rioux, J.A., Pasteur, N., Killick-Kendrick, R. and Pratlong, F.:** Signification du polymorphisme enzymatique chez les leishmanies. A propos de trois souches hétérozygotes de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, *Leishmania cf tarentolae* Wenyon, 1921 et *Leishmania aethiopica* Bray, Ashford et Bray, 1973. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 56. (1981) 99-112.
- Mallinson, D.J. and Coombs, G.H.:** Interaction of *Leishmania* metacyclics with macrophages. *Int. J. Parasitol.* 19. (1989) 647-656.
- Margulis, L., Sagan, D., and Olendzenski, L.:** What is sex ? In: The origin and evolution of sex. Halvorson, H.O., and Monroy, A. editions. New York: Liss. (1985) 69-85.
- Matthews, K.R., Tschudi, C. and Ullu, E.:** A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Gene & Dev.* 8. (1994) 491-501.
- McGill, C., Shafer, B. and Stathern, J.N.:** Coconversion of flanking sequences with homothallic switching. *Cell.* 57. (1989) 459-467.
- Meade, J.C., Shaw, J., Lemaster, S., Gallagher, G. and Stringer, J.R.:** Structure and expression of a tandem gene pair in *Leishmania donovani* that encodes a protein structurally homologous to eucaryotic action transporting ATPases. *Mol. Cell. Biol.* 7 (1987) 3937-3947.
- Medina-Acosta, E., Karess, R. E., Schwartz, H., and Russel, D. G.:** The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. *Mol. Bio. Parasitol.* 37. (1989) 263-274.

- Megee, P.C., Morgan, B.A., Mittman, B.A. and Smith, M.M.:** Genetic analysis of histone H4: essential role of lysines subject to reversible acetylation. *Science*. 247. (1990) 841-845.
- Miller, A.M., MacKay, V.L. and Nasmyth, K.A.:** Identification and comparison of two sequence elements that confer cell-type specific transcription in yeast. *Nature*. 314. (1985) 598-603.
- Miller, A.M. and Nasmyth, K.:** A role for DNA replication in the repression of silent mating-type loci in yeast. *Nature*. 312. (1984) 247-251.
- Miller, R.A., Reed, S.G. and parsons, M.:** *Leishmania* gp63 molecule implicated in cellular adhesion lacks an Arg-Gly-Asp sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* 39. (1990) 267-274.
- Mitchell, A.P. and Herskowitz, I.:** Activation of meiosis and sporulation by repression of the *RME1* product in yeast. *Nature*. 319. (1986) 738-742.
- Moran, E. and Mattwes, M.B.:** Multiple functional domains in the adenovirus *E1A* gene. *Cell*. 48 (1987) 177-178.
- Moretti, P., Freeman, K., Coodly, L., and Shore, D.:** Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes & Dev.* 8. (1994) 2257-2269.
- Morrissey, J. H.:** Silver stain for protein in polyacrylamide gels: modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Annals. Biochem.* 117. (1981) 307-310.
- Mosser, D.M. and Edelson, P.J.:** The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature*. 327. (1987) 329-331.
- Mosser, D.M., Vlassara, H., Edelson, P.J. and Cerami, A.:** *Leishmania* promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation endproducts. *J. Exp. Med.* 165. (1987) 140-145.
- Mosser, D.M., Wedgwood, J.F. and Edelson, P.J.:** *Leishmania* amastigotes: Resistance to complement-mediated lysis is not due to a failure to fix C3. *J. Immunol.* 134. (1985) 4128-4131.
- Mottram, J.C., Kinnaird, J.H., Shiels, B.R., Tait, A. and Barry, D.:** A novel CDC2-related protein kinase from *Leishmania mexicana*, LmmCRK1, is post-translationally regulated during the life cycle. *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 497-507.

- Nash, T.E. and Mowatt, M.R.:** Variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia* are zinc binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90. (1993) 5489-5493.
- Nasmyth, K.A.:** Molecular analysis of a cell lineage. *Nature*. 302.(1983) 670-676.
- Nickoloff, L.A., Chen, E.Y., Heffron, F.:** A 24-base pair DNA sequence from the *MAT* locus stimulates intergenic recombination in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78. (1986) 7831-7835.
- Olliario, P.L. and Bryceson, A.D.M:** Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitol. Today*. 9. (1993) 323-328.
- Olmsted, J. B.:** Affinity purification of antibodies from diazotised paper blots of heterogeneous protein samples. *J. Biol. Chem*. 250. (1981) 11955-11957
- Ouaissi, M.A.:** Role of the RGD sequence in parasite attachment to host cells. *Parasitol. Today*. 4. (1988) 169-173.
- Ouaissi, M.A., Aguirre, T., Plumas-Marty, B., Piras, M., Schöneck, R., Gras-Masse, H., Taïbi, A., Loyens, M., Tartar, A., Capron, A. and Piras, R.:** Cloning and sequencing of a 24-kDa *Trypanosoma cruzi* specific antigen released in association with membrane vesicles and defined by a monoclonal antibody. *Biol. Cell*. 75 (1992) 11-17.
- Ouaissi, M. A., Taïbi, A., Cornette, J. Velge, P., Marty, B., Loyens, M., Esteva, M., Rizvi, F. S., and Capron, A.:** Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. *Parasitology* . 100. (1990) 115-124.
- Ouaissi, M. A., Taïbi, A., Loyens, M., Martin, U., Afchain D., Maidana, C., Caudioti, C., Cornette, J., Martelleur, A., Velge, P., Marty, B., and Capron A.:** *Trypanosoma cruzi*: a carbohydrate epitope defined by a monoclonal antibody as a possible marker of the acute phase of human Chagas' disease. *Amer. J.Trop. Med. Hyg*. 45. (1991) 214-25.
- Pages, M., Bastien, P. and Blaineau, C.:** Reply. *Parasitol. Today*. 9. (1992) 306.
- Pages, M., Bastien, P., Veas, F., Rossi, V., Bellis, M., Winker, P., Rioux, J.A. and Roizès, G.:** Chromosome size and number polymorphisms in *Leishmania infantum* suggest

amplification/ deletion and possible genetic exchange. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36. (1989) 161-168.

Paindavoine, P., Zampetti-Bosseler, F., Pays, E., Schweizer, J., Guyaux, M., Jenni, L. and Steiner, M.: Trypanosome hybrids generated in tsetse flies by nuclear fusion. *EMBO J.* 5. (1986) 3631-3636.

Palmer, G., Louvion, J.F., Tibbets, R.S., Engman, D.M. and Picard, D.: *Trypanosoma cruzi* heat-shock protein 90 can functionally complement yeast. *Mol. Biochem. Parasitol.* 70. (1995) 203-206.

Panton, L.J., Tesh, R.B., Nadeau, K.C. and Beverley, S.M.: A test for genetic exchange in mixed infection of *Leishmania major* in the sand fly *Phlebotomus papatasi*. *J. Parasitol.* 38. (1991) 224-228.

Pays, E.: Genome organization and control of gene expression in trypanosomatids. In: "The Eukaryotic Microbial Genome" (P.M. Broda, S.G. Oliver, and P. Sims, Eds), pp.99-132. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK. (1993).

Perry, K. and Agabian, N.: mRNA processing in the *Trypanosomatidae*. *Experientia.* 47. (1991) 118-128.

Peterson, C.L., and Herskowitz, I.: Characterization of the yeast *SWI1*, *SWI2*, and *SWI3* genes, which encode a global activator of transcription. *Cell.* 57. (1992) 573-583.

Pimenta, P.F., Da Silva, R.P., Sacks, D.L. and Pinto Da Silva, P.: Cell surface nanoanatomy of *Leishmania major* as revealed by fracture-flip. A surface meswork of 44 nm fusiform filaments identifies infective developmental stage promastigotes. *Eur. J. Cell. Biol.* 48. (1989) 180-190.

Plumas-Marty, B., Taibi, A., Pessoa, H., Verwaerde, C., Loyens, M., Pommier, V., Velge, P., Capron, A. and Ouaisi, M. A.: *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins (TcGBP): protection induced by native proteins in an experimental model and analysis of the antibody response. *Res. Immunol.* 144. (1993) 553-563.

- Plumas-Marty, B., Schöneck, R., Billaut-Mulot, O., Taibi, A., Capron, A., and Ouaissi, M. A.:** Molecular cloning of *Trypanosoma cruzi* protein homologous to elongation factors 1 β . *Parasitol. Res.* 80. (1993) 626-628.
- Plumas-Marty, B., Verwaerde, C., Loyens, M., Velge, P., Taibi, A., Cesbron, M. F., Capron, A., and Ouaissi, M. A.:** *Trypanosoma cruzi* glutathione binding proteins: immunogenicity during human and experimental chagas' disease. *Parasitology* . 104. (1992) 87-98.
- Puentes, S.M., Sacks, D.L., Da Silva, R.P. and Joiner, K.A.:** Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubations in normal human serum. *J. Immunol.* 143. (1990) 3743-3749.
- Pupkis, M. F., Tetley, L., and Coombs, G.H.:** *Leishmania mexicana*: amastigote hydrolases in unusual lysosomes. *Exp. Parasitol.* 62. (1986) 29-39.
- Raikov, I.B.:** The protozoan nucleus. Morphology and evolution. Springer. Vienne. (1982).
- Rawlins, D.J., and Shaw, P.J.:** Localization of ribosomal and telomeric DNA sequences in intact plant nuclei by *in-situ* hybridization and three-dimensional optical microscopy. *J. Microscop.* 157. (1990) 83-89.
- Renauld, H., Aparicio, O.M., Zierath, P.D., Billington, B., Chablani, S., and Gottschling, D.E.:** Silent domains are assembled continuously from the telomere and are defined by promoter distance and strength, and by *SIR3* dosage. *Genes. & Dev.* 7 (1993) 1133-1145.
- Rine, J., Sprague, Jr., and Herskowitz, I.:** *rme 1* mutation of *Saccharomyces cerevisiae* : map position and bypass of mating-type locus control of sporulation. *Mol. Cell. Biol.* 1. (1981) 958-960.
- Rine, J., Strathern, J.N., Hicks, J.B. and Herskowitz, I.:** A suppressor of mating-type locus mutations in *Saccharomyces cerevisiae* : Evidence for and identification of cryptic mating-type loci. *Genetics.* 93 (1979) 877-901.
- Rivier, D.H. and Rine, J.:** An origin of DNA replication and a transcription silencer require a common element. *Science.* 256. (1992) 659-663.

- Rizvi, F.S., Ouaisi, M.A., Marty, B., Santori, F. and Capron, A.:** The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a fibronectin-like molecule. *Eur. J. Immunol.* 18. (1988) 473-476.
- Rodgers, M.R., Popper, S.J. and Wirth, D.F.:** Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasitol.* 71. (1990) 267-275.
- Rogers, W.O., Burnheim, P.F. and Wirth, D.F.:** Detection of *Leishmania* within sandflies by kinetoplast DNA hybridization. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 39. (1988) 434-439.
- Russel, D. G. and Alexander, J.:** Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *J. Immunol.* 140. (1988) 1274-1279.
- Russel, D. G. and Talamas-Rohana, P.:** *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. *Immunol. Today.* 10. (1989) 328-333.
- Russel, D.G. and Wright, S.D.:** Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp containing region of the major surface glycoprotein gp63, of *Leishmania* promastigotes. *J.Exp. Med.* 168. (1988) 279-282.
- Ryan, K.A., Shapiro, T.A., Rauch, C.A. and Englund P.T.:** Replication of kinetoplast DNA in trypanosomes. *Annu. Rev. Microbial.* 42. (1988) 339-358.
- Sacks, D. L.:** Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp. Parasitol.* 69. (1989) 100-103.
- Sacks, D. L., Brodin, T. N. and Turco, S. J.:** Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. *Mol. Bio.Parasitol.* 42. (1990) 225-234.
- Sacks, D.L. and Da Silva, R. M.:** The generation of infective stage *Leishmania major* promastigotes is associated with the cell-surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. *J. Immunol.* 139. (1987) 3099-3106.
- Sacks, D.L., Hieny, S. and Sher, A.:** Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective infective developmental stages of *L. major* promastigotes. *J. Immunol.* 135. (1985) 564-567.

- Saito, R.M., Elgort, M.G. and Campbell, D.A.:** A conserved upstream element is essential for transcription of the *Leishmania tarentolae* mini-exon gene. *EMBO J.* 13. (1994) 5460-5469.
- Samaras, N. and Spithill, T.W.:** Molecular karyotype of five species of *Leishmania* and analysis of genes location and chromosomal rearrangements. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25. (1987) 279-291.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.:** Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor NY, (1989).
- Sandell, L.L. and Zakian, V.A.:** Telomeric position effect in yeast . *Trends. Cell. Biol.* 2. (1992) 10-14.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.:** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74 (1977) 5463-5467.
- Schlein, Y.:** *Leishmania* and sandfly interactions in the live cycle and transmission. *Parasitol. Today.* 9. (1993) 255-257.
- Schlein, Y., Jacobson, R. L. and Messer, G.:** *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sanfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89. (1992) 9944-9948.
- Schneider, P., Bordier, C., and Etges, R.:** Membrane proteins and enzymes of *Leishmania*. *Subcellular Biochemistry.* 18. (1992).39-72.
- Schöneck, R., Plumas-Marty, B., Taibi, A., Billaut-Mulot, O, Loyens, M., Gras-Masse, H., Capron, A. and Ouaissi, M.A.:** *Trypanosoma cruzi* cDNA encodes a tandemly repeated domain structure characteristic of small stress proteins and glutathione S-transferases. *Biol. Cell.* 80. (1994) 1-10.
- Searle, C., Campos, A.J.R., Coulson, R.M.R. Soithill, T.W. and Smith, D.F.:** A family of heat shock protein 70-related genes are expressed in the promastigotes of *Leishmania* major. *Nucl. Acids. Res.* 17. (1989) 5081-5095.
- Sexton, J.L., Milner, A.R., Panaccio, M., Waddington, J., Wuijffels, G., Chandler, D., Thompson, C., Wilson, L., Spithill, T.W., Mitchell, G.F. and**

- Campbell, N.J.:** Glutathione S-transferase. A novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J. Immunol.* 145. (1990) 3905-3910.
- Shepherd, J.C.W., McGinnis, W., Carrasco, A.E., De Robertis, E.M., and Gehring, W.J.:** Fly and frog homeo domains show homologies with yeast mating-type regulatory proteins. *Nature.* 310. (1984) 70-71.
- Sherman, F.:** Getting started with yeast. *Methods. Enzymol.* 194 (1991) 3-21.
- Sherman, D.R., Janz, L., Hug, M. and Clayton, C.:** Anatomy of the *parp* gene promoter of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* 10. (1991) 3379-3386.
- Sherwin, T. and Gull, K.:** The cell division cycle of *Trypanosoma brucei*, timing of event markers and cytoskeletal modification. *Phil. Trans. R. Soc. Ser B.* 323. (1989) 573-588.
- Shigenada, Y., and Kaneda, M.:** Studies on the cell fusion process of Heliozoans IV. An electron microscopical study on the fusion process accompanied with axopodial degradation. *Annot. Zool. Jpn.* 52. (1979) 28-39.
- Shore, D., and Nasmyth, K.:** Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencers and activator elements. *Cell.* 51.(1987) 721-732.
- Shore, D., Squire, M., and Nasmyth, K.A.:** Characterization of two genes required for the position-effect control of yeast mating-type genes. *EMBO J.* 3 (1984) 2817-2823.
- Siliciano, P.G., and Tatchell, K.:** Identification of the DNA sequences controlling the expression of the *MAT α* locus of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83. (1986) 2320-2324.
- Simchen, G., and Hugerat, Y.:** What determines whether chromosomes segregate reductionally or equationally in meiosis ?. *Bio Essays.* 15. (1993) 1-8.
- Simons, P. C., and Vander Jagt, D. L.:** Purification of glutathione S-transferase by glutathione-affinity chromatography. *Methods . Enzymol.* 77. (1981) 235-237.
- Simpson, L.:** The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: Genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* 41(1987) 363-382.
- Smith, D.B. and Johnson, K.S.:** Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 67 (1988) 31-40.

- Smith, D.F., Searle, S., Ready, P.D., Gramiccia, M. and Ben, I.R.:** A kinetoplast Dna probe diagnostic for *Leishmania major* : Sequence homologies between regions of *Leishmania* minicircles. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37. (1989) 213-223.
- Soteriadou, K.P., Remoundos, M.S., Katsikas, M.C., Tzinia, A.K., Tsikaris, V., Sakarellos, C. and Tzartos, S.J.:** The Ser-Arg-Tyr-Asp region of the major surface glycoprotein of *Leishmania* mimics the Arg-Gly-Asp-Ser cell attachment region of fibronectin. *J. Biol. Chem.* 267. (1992) 13980-13985.
- Sousa, M.A.:** Cell-to-cell interactions suggesting a sexual process in *Herpetomonas megaseliae* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Parasitol. Res.* 80. (1994) 112-116.
- Sternberg, J., Tait, A., Haley, S., Wells, J.M., Le Page, R.W.F., Schweizer, J. and Jenni, L.:** Genetic exchange in African trypanosomes: characterization of a new hybrid genotype. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27. (1987) 191-200.
- Stevens, J.R. and Tybayrenc, M.:** Detection of linkage disequilibrium in *Trypanosoma brucei* isolated from tsetse flies and characterized by RAPD analysis and isoenzymes. *Parasitol.* 110. (1995) 181-186.
- Strathern, J.N., Hicks, J.B., and Herskowitz, I.:** Control of cell type in yeast by the mating type locus: the $\alpha 1$ - $\alpha 2$ hypothesis. *J. Mol. Biol.* 147. (1980).357-372.
- Strathern, J.N., Spatola, E., McGill, C., and Hicks, J.B.:** Structure and organization of transposable mating type cassettes in *Saccharomyces* yeasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77. (1980) 2839-2843.
- Stuart, K.:** RNA editing in trypanosomatid mitochondria. *Annu. Rev. Microbiol.* 45. (1991) 327-344
- Stuart, K. and feagin, J.E.:** Mitochondrial DNA of Kinetoplastids. *Inter. Rev. Cytol.* 141. (1992) 65-88.
- Sugawara, N. and Haber, J.E.:** Characterization of double-strand break-induced recombination: homology requirements and single-stranded DNA formation. *Mol. Cell. Biol.* 12. (1992) 563-575.

- Taibi, A., Plumas-Marty, B., Guevara-Espinosa, A., Schöneck, R., Pessoa, H., Loyens, M., Piras, R., Aguirre, T., Gras-Masse, H., Bossus, M., Tartar, A., Capron, A. and Ouaissi, A.:** *Trypanosoma cruzi* : Immunity-induced in mice and rats by trypomastigote excretory- secretory antigens and identification of a peptide sequence containing a T cell epitope with protective activity. *J. Immuno.* 151 (1993) 2676-2689.
- Tait, A.:** Evidence for diploidy and mating in Trypanosomes. *Nature.* 287. (1980) 536-538.
- Tait, A.:** Sexual process in the kinetoplastida. *Parasitol.* 86. (1983) 29-57.
- Tait, A. and Turner, C.M.R.:** Genetic exchange in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Today.* 6. (1990) 70-75.
- Talamas-Rohana, P., Wright, S.D., Lennartz, M.R. and Russel, D.G.:** Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, P150,95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. *J. Immunol.* 144. (1990) 4817-4824.
- Tartof, K., and Bremer, M.:** Mechanisms for the construction and developmental control of heterochromatin formation and imprinted chromosomal domains. *Development.* 120. Supplement. (1990) 35-45.
- Thiemann, O.H., Maslov, D.A. and Simpson, L.:** Disruption of RNA editing in *Leishmania tarentolae* by the loss of minicircle- encoded guide RNA genes. *EMBO J.* 13. (1994) 5689-5700.
- Tibayrenc, M.:** *Leishmania* : Sex, Karyotypes and Population Genetics. *Parasitol. Today.* 9. (1992) 305-306.
- Tibayrenc, M.:** Clonality in *Leishmania*. *Parasitol. Today.* 2. (1993) 58.
- Tibayrenc, M., Criou, M., Solignac, M. and Cartier, Y.:** Arguments génétiques contre l'existence d'une sexualité actuelle chez *T. cruzi*. Implications taxonomiques. *C. R. Acad. Sci.* 293. (1981c) 204-209.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F. and Ayala, F.J.:** A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87. (1990) 2414-2418.

- Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabe, C., Guerrini, F., Skarecky, D. and Ayala, F.J.:** Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90. (1993) 1335-1339.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.:** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* . 76. (1979) 4350-4354.
- Traverse, K.L., and Pradue, M.L.:** Studies of He-T DNA sequences in the pericentric regions of *Drosophila* chromosomes. *Chromosoma*. 97. (1989) 261-271.
- Van Der Ploeg, L.H.T, Cornelissen, A.W.C.A., Barry, J.D. and Borst, P.:** Chromosomes of Kinetoplastida. *EMBO. J.* 3. (1984a) 3109-3115.
- Van Der Ploeg, L.H.T, Liu, A.Y.C. and Borst, P.:** Structure of the growing telomeres of Trypanosomes. *Cell*. 36. (1984b)
- Vassella, E., Braun, R. and Roditi, I.:** Control of polyadenylation and alternative splicing of transcripts from adjacent genes in a procyclin expression site: a dual role for polypyrimidine tracts in trypanosomes? *Nuc. Acids. Res.* 22. (1994) 1359-1364.
- Vickerman, K.:** The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Inter. J. Parasitol.* 24. (1994) 1317-1331.
- Vickerman, K. and Preston, T.M.:** Spindle microtubules in dividing nuclei of trypanosomes. *J. Cell. Sci.* 6. (1970) 365-383.
- Walker, C.L., Cargile, C.B., Floy, K.M., Dellanoy, M., and Migeon, B.:** The barry body is a looped X chromosome formed by telomere association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88. (1991) 6191-6195.
- Walters, L.L, Chaplin, G.L, Modi, G.B. and Tesh, R.B.:** Ultrastructural biology of *Leishmania (Vianna) panamensis* (= *Leishmania braziliensis braziliensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychotidae): a natural host-parasite association. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40. (1989a) 19-39.

- Walters, L.L., Modi, G.B., Chaplin, G.L. and Tesh, R.B.:** Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychotidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41. (1989b) 295-317.
- Walliker, D., Carter, R. and Morgan, S.:** Genetic recombination in malaria. *Nature.* 232. (1971) 561-562.
- Webster, P. and Fish W. R.:** Endocytosis by african trypanosomes II. Occurrence in different life-cycle stages and intracellular sorting. *Eur. J. Cell Biol.* 49. (1989) 303-310.
- Webster, P. and Russel, D.G.:** The flagellar pocket of Trypanosomatids. *Parasitol. Today.* 9. (1993) 201-205.
- Wells, J.M., Prospero, T.D., Jenni, L., Le Page and R.W.F.:** DNA contents and molecular karyotypes of hybrid *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 249. (1987) 103-116.
- White, C.I. and Haber, J.E.:** Intermediates of recombination during mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO. J.* 9. (1990) 663-673.
- Wilson, M.E. and Pearson, R.D.:** Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. *J. Immunol.* 136. (1986) 4681-4688.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafolski, J.A. and Tingey, S.V.:** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.* 10. (1990) 6531-6535.
- Wirth, D.F. and McMahon-Pratt, D.:** Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79. (1982) 6999-7003.
- Wirth, D.F., Rogers, W.O., Barker, R.J., Dourado, L. Suesebang, L. and Albuquerque, B.:** Leishmaniasis and malaria: new tools for epidemiologic analysis. *Science.* 234. (1986) 975-979.

- Wong, A.K.C., Curotto de Lafaille, M.A. and Wirth, D.F.:** Identification of a *cis*-acting gene regulatory element from the *lemdr1* locus of *Leishmania enriettii*. *J. Biol. Chem.* 269. (1994) 26497-26502.
- Yahiaoui, B., Loyens, M., Taibi, A., Schöneck, R., Dubremetz, J.M. and Ouaissi, M.A.:** Characterization of a *Leishmania* antigen associated with cytoplasmic vesicles ressembling endosomal-like structure. *Parasitol.* 107 (1993) 497-507.
- Yawetz, A. and Agosin, M.:** Purification of the glutathione S-transferase of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 68B. (1981) 237-243.
- Zilberstein, D. and Shapira, M.:** The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. microbiol.* 48. (1994) 449-470.
- Zhang, Y., Li, E. and Stanley, S.L.:** The *EHZc3* cDNA clone encodes a Zinc-binding protein. *Exp. Parasitol.* 77 (1993) 118-120.
- Zomerdijk, J.C.B.M., Ouellette, M., Ten Asbroek, A., Kieft, R., Bommer, A., Clayton, C.E. and Borst, P.:** The promoter for a variant surface glycoprotein gene expression site in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* 9. (1990) 2791-2801.

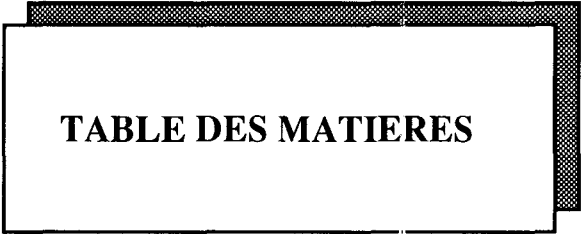


TABLE DES MATIERES

Abréviations.....	7
INTRODUCTION.....	11
1. PRESENTATION DES LEISHMANIOSES.....	12
1.1. Historique.....	12
1.2. Répartition géographique des leishmanioses.....	13
1.2.1. Le foyer méditerranéen.....	13
1.2.2. Le foyer indien.....	13
1.2.3. Le foyer chinois.....	13
1.2.4. Le foyer d'Asie centrale.....	13
1.2.5. Le foyer d'Afrique tropicale.....	13
1.2.6. Le foyer sud-américain.....	15
1.3. Les parasites.....	15
1.4. Les vecteurs.....	15
1.5. Cycle évolutif des leishmanies.....	17
1.6. Les différentes formes de la leishmaniose.....	19
1.6.1. La leishmaniose viscérale.....	19
1.6.1.1. Signes cliniques.....	19
1.6.1.2. Signes biologiques.....	20
1.6.2. Les leishmanioses cutanées.....	20
1.6.2.1. Signes cliniques.....	20
1.6.2.2. Signes biologiques.....	22
1.6.3. La leishmaniose cutanéomuqueuse (Espundia).....	22

1.7.	Diagnostic des leishmanioses.....	22
1.7.1.	Examens direct.....	22
1.7.2.	Test d'hypersensibilité retardée.....	23
1.7.3.	Diagnostic immunologique.....	23
1.7.4.	Les sondes ADN spécifiques d'espèces.....	24
1.8.	Traitement.....	25
1.8.1.	Antimoniés pentavalents.....	25
1.8.2.	Iséthionate de pentamidine.....	26
1.8.3.	Amphotéricine B.....	26
1.8.4.	Allopurinol.....	26
1.8.5.	L'immunothérapie.....	27
2.	BIOLOGIE CELLULAIRE DES LEISHMANIES.....	27
2.1.	Ultrastructure et organites spécifiques des <i>kinetoplastida</i>	27
2.1.1.	Membrane, microtubules et cytosquelette.....	27
2.1.2.	Le kinétoplaste.....	27
2.1.3.	La poche flagellaire et le flagelle.....	28
2.1.4.	Les glycosomes.....	28
2.2.	Relations hôte-parasite.....	29
2.2.1.	Développement des leishmania chez le vecteur et leur transmission.....	29
2.2.2.	La métacyclogénèse des promastigotes des leishmanies.....	30
2.2.3.	Interaction des leishmanies avec les macrophages.....	31
2.2.3.1.	Les récepteurs (CR1/CR3).....	32
2.2.3.2.	Les récepteurs de la fibronectine, mannose-fucose et AGE.....	32
2.2.3.3.	Rôle des molécules de surface des leishmanies.....	32
3.	BIOLOGIE MOLECULAIRE DES LEISHMANIES.....	34
3.1.	Le génome des leishmanies.....	34

3.2.	L'ADN kinétoplastique.....	35
3.2.1.	Les maxi-cercles.....	35
3.2.2.	Les mini-cercles.....	35
3.3.	L'édition de l'ARN.....	36
3.3.1.	L'ARN guide.....	36
3.3.2.	Le mécanisme de l'édition.....	37
3.4.	Les éléments de séquences régulatrices en <i>cis</i> de l'expression des gènes des <i>Trypanosomatidae</i>	38
4.	GENERALITES SUR LA REPRODUCTION SEXUEE.....	40
4.1.	Définition de la reproduction sexuée.....	40
4.2.	Origine de la diploïdie.....	40
4.3.	Origine de la méiose.....	41
4.4.	La différenciation sexuelle.....	41
5.	LA COMMUTATION DU TYPE SEXUEL CHEZ LA LEVURE.....	42
5.1.	Structure et organisation des loci <i>HML</i> α , <i>HMR</i> α , <i>MAT</i> α et <i>MAT</i> a	43
5.2.	Le contrôle physiologique et génétique de la commutation.....	44
5.3.	Le mécanisme moléculaire de la commutation du locus <i>MAT</i>	44
5.3.1.	La coupure de <i>MAT</i> par l'endonucléase HO.....	44
5.3.2.	La digestion des extrémités par une exonucléase 5'->3'.....	44
5.3.3.	Invasion du site donneur et extension d'amorce.....	46
5.3.4.	Les étapes finales de la commutation.....	46
5.4.	Programmation et choix de la direction de déplacement de la cassette..	47
5.5.	Les protéines régulatrices codées par les gènes <i>MAT</i> a et <i>MAT</i> α	47
5.6.	La répression des loci <i>HML</i> et <i>HMR</i>	48
5.7.	Les sites de répression agissant en <i>cis</i>	49
5.8.	Les gènes qui agissent en trans dans le mécanisme de la répression...	50
5.9.	La répression au niveau des télomères.....	50
5.10.	Rôles des protéines SIR1-4.....	51

6. LE MODE DE PROPAGATION DES <i>TRYPANOSOMATIDAE</i>.....	53
6.1.Méthodologie et approches expérimentales.....	53
6.1.1. La méthode cytologique.....	53
6.1.2. La méthode biochimique: analyses isoenzymatiques.....	54
6.1.3. Les méthodes de biologie moléculaire.....	54
6.1.4. Utilisation des marqueurs de sélection.....	55
6.2. Les évidences en faveur de l'existence d'une reproduction sexuée.....	55
chez les <i>Trypanosomatidae</i>	55
6.2.1. Cas de <i>Trypanosoma brucei</i>	55
6.2.2. Cas des leishmanies.....	57
6.3. La théorie clonale.....	59
BUT DU TRAVAIL.....	61
TRAVAUX PERSONNELS.....	64
Article n°1: Caractérisation d'antigènes de <i>Leishmania</i> , localisés dans des vésicules cytoplasmiques assimilables aux endosomes des eucaryotes supérieurs.....	65
Article n°2: Clonage et caractérisation moléculaire d'un ADNc de <i>Leishmania major</i> codant pour une protéine homologue au produit du gène <i>SIR2</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	93
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	116
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	127
TABLE DES MATIERES.....	152

