

2m11.2669.9

Université de Montréal

Clonage et caractérisation du gène *TOP1* de *Leishmania donovani*.

par

Sonia Broccoli

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.)

en microbiologie et immunologie

Décembre, 1998

©Sonia Broccoli, 1998



W
4
U58
1999
V.035



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:
Clonage et caractérisation du gène *TOP1* de *Leishmania donovani*.

présenté par
Sonia Broccoli

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jacques Thibodeau

Dr. Marc Drolet

Dr. Éric Cohen

Mémoire accepté le.....99-04-06.....

Sommaire

Le protozoaire du genre *Leishmania*, membre de la famille des trypanosomes, est un parasite intracellulaire qui infecte les macrophages des mammifères. Suivant l'infection par *Leishmania*, plusieurs pathologies peuvent se développer selon les espèces en cause: la leishmaniose cutanée, la leishmaniose mucocutanée et la leishmaniose viscérale mortelle. L'incidence des leishmanioses est actuellement à la hausse pour plusieurs raisons, dont la résistance croissante du parasite vis-à-vis les chimiothérapies actuelles.

Les ADN topoisomérases sont des enzymes impliquées dans toutes les fonctions de l'ADN. Elles exercent leurs effets en modulant le niveau de surenroulement de la double hélice, et en réglant les problèmes topologiques associés avec le mouvement des fourches de réplication et des complexes de transcription, avec la ségrégation, la condensation et la décondensation des chromosomes. Les ADN topoisomérases I exercent leurs activités en introduisant des cassures transitoires dans l'ADN, servant de pivot pour les brins d'ADN impliqués et catalysant ainsi l'interconversion des isomères topologiques ou topoisomères. Les poisons anti-topoisomérase I stabilisent l'intermédiaire ADN clivé/topoisomérase et sont à l'origine de l'accumulation de cassures permanentes dans l'ADN. Il s'en suit une inhibition de la réplication et un arrêt du cycle cellulaire, menant éventuellement à la mort cellulaire.

Le but de cette étude était de mettre au point un système *in vitro* permettant le criblage de composés ayant pour cible la topoisomérase I de *Leishmania donovani*, en vue de développer de nouvelles thérapies destinées au traitement des leishmanioses. L'hypothèse est que la topoisomérase I du parasite possède des caractéristiques la distinguant de son homologue humain et que ces dernières peuvent être exploitées pour établir une sélectivité des composés.

Par criblage d'une banque génomique, nous avons cloné le gène *TOP1* de *Leishmania donovani* et nous l'avons séquencé; ceci dans le but d'obtenir des quantités suffisantes d'enzyme pour nos études. Le produit de ce gène est une protéine de 635 acides aminés démontrant une identité de 38,4% et une homologie de 54,4% avec la topoisomérase I humaine, mais ne possédant pas de site actif conventionnel (tyrosine). Suite à l'expression de cette protéine chez *Escherichia coli*, nous avons été incapables de détecter quelque activité de relaxation que ce soit dans les différentes conditions testées. Nous avons exclu la possibilité que nous avions cloné un pseudogène par une série d'hybridations à l'aide de la technique de Southern. Nous avons étudié l'expression du gène au cours du cycle cellulaire du parasite et nous avons également vérifié son expression chez d'autres trypanosomes par la technique de Northern. Les différentes possibilités quant à la contribution de ce gène à une activité topoisomérase I chez le parasite sont discutées.

Mots clés : trypanosomes, *Leishmania donovani*, topoisomérase I, poisons anti-topoisomérase

Table des matières

Identification du jury.....	ii
Sommaire.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
1. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
1.1. <i>LEISHMANIA DONOVANI</i>	2
1.1.1. Historique et classification.....	2
1.1.2. Morphologie du parasite <i>Leishmania</i>	4
1.1.3. Cycle de transmission.....	5
1.1.4. Pathogénèse.....	9
1.1.5. Pathologie.....	12
1.1.6. Génétique de <i>Leishmania</i>	13
1.1.7. Les traitements contre les leishmanioses.....	15
1.2. LES ADN TOPOISOMÉRASES.....	16
1.2.1. La topologie de l'ADN.....	16
1.2.2. Définition et rôles des ADN topoisomérases.....	18
1.2.3. Classification des ADN topoisomérases.....	20
1.2.3.1. La topoisomérase de type I procaryote.....	21
1.2.3.2. La topoisomérase de type I eucaryote.....	24
1.2.3.3. Les topoisomérases de type II.....	24
1.2.4. Analyse de séquence et de structure de la topoisomérase I eucaryote.....	26

1.2.5. Autres activités de la topoisomérase I eucaryote.....	29
1.3. LES POISONS ANTI-TOPOISOMÉRASE I.....	32
1.3.1. Les familles de composés anti-topoisomérase I.....	32
1.3.1.1. Les composés qui lient le complexe clivé.....	32
1.3.1.1.1. La camptothécine: un alcaloïde d'origine végétale.....	33
1.3.1.1.2. La sensibilité aux composés liant le complexe clivé chez <i>L. donovani</i> ..	34
1.3.1.2. Les composés qui lient l'ADN.....	35
1.3.1.2.1. Les benzimidazoles.....	36
1.3.1.2.2. La sensibilité aux MGBLs chez <i>L. donovani</i>	36
1.3.2. La résistance aux composés anti-topoisomérase I.....	37
1.3.2.1. Les mécanismes de résistance aux drogues anti-topoisomérase I.....	38
1.3.2.2. La résistance à la camptothécine.....	38
1.4. L'UTILISATION DES POISONS ANTI-TOPOISOMÉRASE I DANS LE TRAITEMENT DES LEISHMANIOSES.....	39
2. ARTICLE.....	42
Résumé.....	43
Page titre.....	45
2.1. ABSTRACT.....	46
2.2. INTRODUCTION.....	47
2.3. MATERIAL AND METHODS.....	50
2.4. RESULTS AND DISCUSSION.....	53
2.5. ACKNOWLEDGEMENTS.....	74
2.6. REFERENCES.....	75
3. DISCUSSION.....	81

4. CONCLUSION.....	93
5. RÉFÉRENCES.....	95
6. ANNEXE.....	112
7. REMERCIEMENTS.....	114

Liste des tableaux**DANS LA REVUE DE LA LITTÉRATURE****Tableau I:** Vecteurs connus d'espèces de *Leishmania* infectant l'Homme.....8**Tableau II:** Classification et propriétés des topoisomérases.....22

Liste des figures

DANS LA REVUE DE LA LITTÉRATURE

Figure 1. Classification du protozoaire <i>Leishmania donovani</i>	2
Figure 2. Diagramme des structures internes de <i>Leishmania</i>	3
Figure 3. Morphologies de <i>Leishmania</i>	4
Figure 4. Cycle de transmission du parasite <i>Leishmania</i> chez l'humain et chez l'insecte vecteur.....	7
Figure 5. Topologie de l'ADN.....	17
Figure 6. Réaction de transestérification.....	19
Figure 7. Les quatre étapes du mécanisme de relaxation de l'ADN par la topoisomérase I procaryote.....	23
Figure 8. Structure cristallographique de la topoisomérase I humaine reconstituée.....	28
Figure 9. Mécanisme d'action des composés qui lient le complexe clivé.....	33

DANS L'ARTICLE

Figure 10. Restriction map of the <i>TOP1</i> -like gene from <i>Leishmania donovani</i> ...	63
Figure 11. Sequence alignment of the TopoI-like protein from <i>Leishmania donovani</i>	65
Figure 12. The first set of Southern blots to screen for the presence of <i>TOP1</i> - like pseudogenes in <i>Leishmania donovani</i>	67
Figure 13. The second set of Southern blots to screen for the presence of <i>TOP1</i> - like pseudogenes in <i>Leishmania donovani</i>	69

Figure 14. Expression of the <i>TOP1</i> -like gene from <i>Leishmania donovani</i> in relation to its growth.....	71
Figure 15. Detection of <i>TOP1</i> -like messengers in various kinetoplastid parasites.....	73
 DANS L'ANNEXE	
Figure 16. Essais de relaxation.....	113

Liste des abbréviations

A: adénine

ADN: acide désoxyribonucléique

ADN-B: molécule d'ADN ayant adopté la conformation dite B

ADNk: ADN du kinétoplaste ou ADN mitochondrial des kinétoplastes

ARN: acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ATP: adénosine triphosphate

ATPase: enzyme qui hydrolyse l'ATP

C-terminal: carboxy-terminal

EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique

H⁺: ion hydrogène

H⁺-ATPase: translocation de protons (H⁺) suite à une hydrolyse d'ATP

Ho: colorant Hoechst

IL-1: interleukine-1

INF- γ : interféron gamma

kb: kilobase(s)

kDa: kiloDalton(s)

LPG: lipophosphoglycan

M: molaire

Mb: mégabase(s)

Mg²⁺: ion magnésium

μ M: micromolaire

mM: millimolaire

N-terminal: amino-terminal

NAD: nicotinamide adénine dinucléotide

O₂: oxygène

OH: groupement hydroxyl

ORF: «open reading frame» ou cadre de lecture ouvert

pb: paire(s) de base(s) (ou **bp:** «base pair(s)»)

Réf.: référence

SbV: antimoine pentavalent

T: thymidine

Top1 (ou Topo I): topoisomérase I eucaryote (ou IB)

Topo II: topoisomérase II

Topo III: topoisomérase III

1. REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1. *LEISHMANIA DONOVANI*

1.1.1. Historique et classification

En 1900, William Leishman fit la découverte de *Leishmania donovani* sur des frottis spléniques d'un soldat, mort d'une infection que ce dernier avait contracté à Dum-Dum en Inde (Faust & Russel, 1964). Les observations de Leishman ont été publiées en 1903, année pendant laquelle Charles Donovan observa le même parasite dans une biopsie de la rate. *Leishmania donovani* est un protozoaire dont la classification est présentée à la figure 1.

Embranchement:	<i>Sarcomastigophora</i>
Sous-Embranchement:	<i>Mastigophora</i>
Classe:	<i>Zoomastigophora</i>
Ordre:	<i>Kinetoplastida</i>
Sous-Ordre:	<i>Trypanosomatina</i>
Famille:	<i>Trypanosomatidae</i>
Genre:	<i>Leishmania</i>
Espèce:	<i>L. donovani</i>

Figure 1. Classification du protozoaire *Leishmania donovani*.

Un protozoaire peut être défini comme étant un protiste unicellulaire eucaryote habituellement mobile. Les protozoaires sont reliés uniquement sur la base de leur caractère unicellulaire (Prescott *et al.*, 1995). L'embranchement des *Sarcomastigophora* est constitué des flagellés et des amibes possédant un seul type de noyau. Le sous-embranchement des *Mastigophora* (ou flagellés) comprend les phytoflagellés, les flagellés à chloroplastes et organismes apparentés, ainsi que les zooflagellés. Les zooflagellés sont dépourvus de chlorophylle (Prescott *et al.*, 1995). La reproduction asexuée se fait par scission binaire le long de l'axe principal du corps

(Chang *et al.*, 1985). Les zooflagellés sont caractérisés par la présence d'un ou de plusieurs flagelles et les représentants sont pour la plupart mononucléés. Chez un groupe important, les kinétoplastidés, l'unique mitochondrie (ou kinétoplaste) est située à la base du flagelle et cette dernière s'étend en plusieurs sections sous la membrane du parasite (voir figure 2). De nombreux zooflagellés sont des parasites

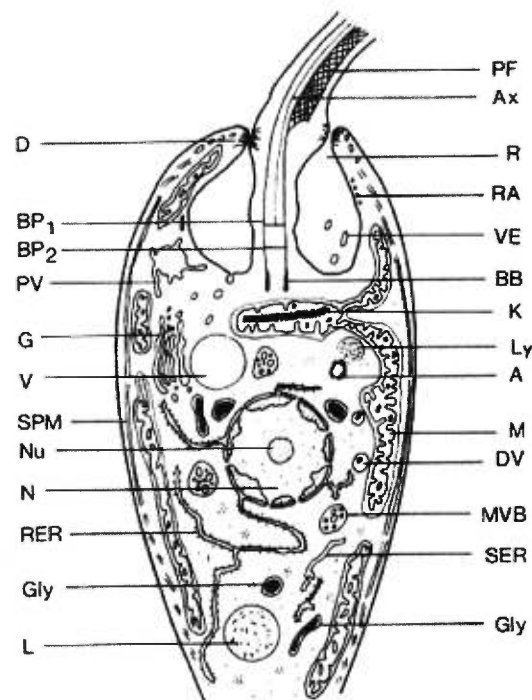


Figure 2. Diagramme des structures internes de *Leishmania*.

A:acanthosome; AX:axonème; BB:corps basal; BP1:plaque basale1; BP2:plaque basale 2; D:desmosome; DV:corps d'inclusion dense; G:appareil de Golgi; Gly:glycosome; K:kinétoplaste; L:goutte de lipide; LY:lysosome; M:mitochondrie; MVB:corps multivésiculaire; N:noyau; Nu:nucléole; PF:tige para-axiale ou para-flagellaire (chez les promastigotes de certaines espèces seulement); PV:vésicule pulsatoire; R:réservoir flagellaire; RA:microtubules cytopharyngiques (associées au réservoir); RER:réticulum endoplasmique rugueux; SPM:microtubules sous-pelliculaires; SER:réticulum endoplasmique lisse; V:vacuole; VE:vésicule.

Tiré de Chang *et al.*, 1985.

humains importants, dont les trypanosomes qui sont des germes pathogènes du sang chez l'Homme et les animaux dans certaines parties du monde. On les appelle également des hémoflagellés (Prescott *et al.*, 1995).

1.1.2. Morphologie du parasite *Leishmania*

Les parasites du genre *Leishmania* existent sous deux formes morphologiquement distinctes: une forme extracellulaire appelée le promastigote, identifiée pour la première fois par Leonard Rogers en 1904, et une forme intracellulaire obligatoire appelée l'amastigote, mise en évidence par un dénommé Patton en 1907 (Faust & Russel, 1964). Ces deux morphologies sont présentées à la figure 3. Le promastigote est une cellule allongée et flagellée dont la taille varie entre 2



Figure 3. Morphologies de *Leishmania*.
A) Promastigote (forme extracellulaire) de *L. donovani* en culture (6975x).
B) Amastigote (forme intracellulaire) de *L. donovani* isolé de la rate d'un hamster infecté (13 950x). Tiré de Chang *et al.*, 1985.

et 20 microns. L'amastigote est plutôt arrondi, non flagellé et le noyau y est refoulé vers la périphérie. Il mesure généralement entre 2 et 5 microns (Chang *et al.*, 1985). Chez l'humain et les autres mammifères infectés, le parasite est présent sous la forme amastigote que l'on retrouve principalement dans les monocytes, les leucocytes polymorphonucléaires et/ou dans les cellules endothéliales (Faust & Russel, 1964). *Leishmania donovani* vit et se multiplie dans les macrophages fixes de la rate ou du foie des personnes infectées. On le retrouve également dans les histiocytes libres. En résumé, l'habitat naturel de *Leishmania donovani* chez l'Homme est le système réticulo-endothélial des viscères; plus spécifiquement, la rate, le foie, la moelle osseuse, la muqueuse intestinale et les ganglions mésentériques. Le parasite se développe également dans les cellules endothéliales des reins, des capsules surrénales, des poumons, des méninges et du fluide cérébrospinal. De façon moins fréquente, on le retrouve dans les macrophages de la paroi intestinale. Des amastigotes ont également été isolés des selles, de l'urine et même des sécrétions nasales de quelques patients (Faust & Russel, 1964). La forme promastigote du parasite est généralement retrouvée dans le système digestif de certains insectes (Chang *et al.*, 1985).

1.1.3. Cycle de transmission

Les protozoaires flagellés, dont le parasite *Leishmania donovani*, sont transmis aux humains et aux autres mammifères par des morsures d'arthropodes. Toutes les espèces de *Leishmania* se développent chez des insectes des genres *Phlebotomus*, *Lutzomyia* ou *Psychodopygus* (Prescott *et al.*, 1995). L'espèce *Leishmania donovani* se multiplie généralement chez des représentants du genre *Phlebotomus*, plus

communément appelés « mouches des sables ». Ces insectes sont les vecteurs, ou hôtes intermédiaires du parasite. *Leishmania donovani* est transmis des animaux aux humains ou entre humains par les phlébotomes femelles. Le succès du parasite en tant qu'agent infectieux dépend d'une part, de sa capacité à coloniser le système digestif du phlébotome et d'autre part, de sa faculté d'établir un parasitisme intracellulaire des macrophages de l'hôte mammifère. La figure 4 de la page 7 représente un schéma du cycle vital de *Leishmania* dans le vecteur et dans l'hôte humain. Un cycle vital est déclenché au moment où l'un de ces insectes pique un mammifère déjà infecté. Ainsi, la « mouche des sables » ingère un nombre indéterminé d'amastigotes. Une fois ingéré, le parasite entreprend un stade de différenciation déclenché par les changements de température (de 37 à 25 degrés Celcius) et de pH (de 5 à 8,5) du milieu ambiant (Zilberstein & Shapira, 1994). *Leishmania* adopte alors la forme promastigote. Les promastigotes se divisent dans le système digestif de l'insecte par scission binaire longitudinale. Chez *Leishmania donovani*, la division est déclenchée par la réplication de l'ADN mitochondrial (ou ADNk). Le kinétoplaste s'allonge et se scinde en deux parties égales; puis, le noyau s'accroît également, et se divise de façon mitotique. Un second flagelle est produit pour la cellule fille. Éventuellement, le cytoplasme se divise et deux formes individuelles en résultent (Faust & Russel, 1964). Plusieurs promastigotes s'attachent à la paroi intestinale du phlébotome en insérant leurs flagelles dans les microvilli des cellules épithéliales du système digestif. La colonisation migre ainsi vers le pharynx (Chang *et al.*, 1985). Certains chercheurs estiment que les promastigotes sont attirés chimiotactilement par des sucres, mais cette hypothèse demeure contestée (Bray, 1983a). Suite à une prolifération initiale, quelques

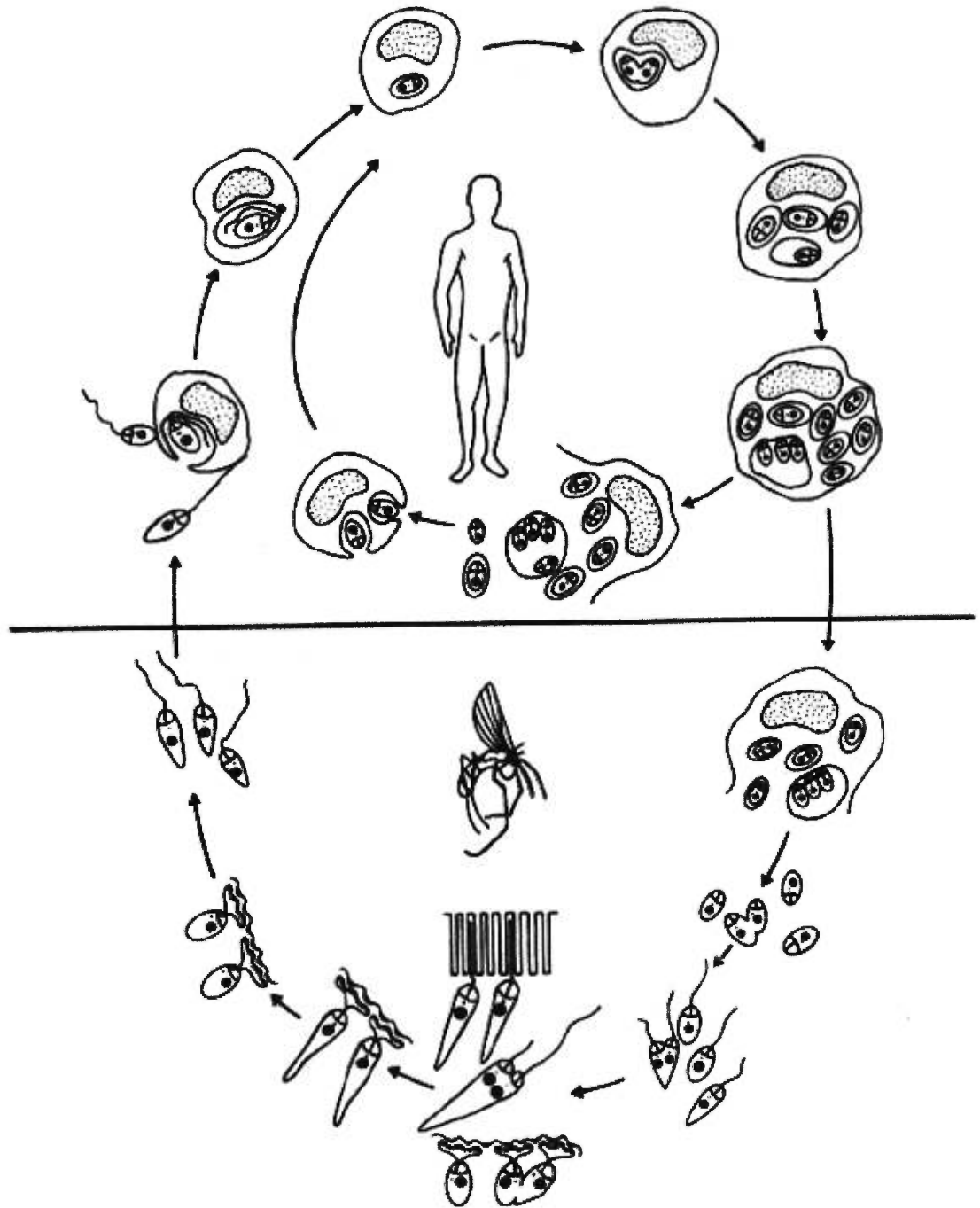


Figure 4. Cycle de transmission du parasite *Leishmania* chez l'humain et chez l'insecte vecteur. Tiré de Chang *et al.*, 1985.

promastigotes vont se différencier d'une forme procyclique non infectieuse en une forme métacyclique virulente et vont migrer vers le haut du système digestif de la mouche (Chang *et al.*, 1985). Le temps écoulé entre l'ingestion des amastigotes et l'injection des promastigotes virulents par le phlébotome peut varier entre 6 et 25 jours selon le système *Leishmania*/insecte en cause. Quelques exemples de ces combinaisons sont présentés dans le tableau I.

Tableau I. Vecteurs connus d'espèces de *Leishmania* infectant l'Homme. Inspiré de Chang *et al.*, 1985.

Espèce d'insecte	Espèce de <i>Leishmania</i>	Pays
<i>Phlebotomus argentipes</i>	<i>L. donovani donovani</i>	Inde
<i>P. ariasi</i>	<i>L. donovani infantum</i>	France
<i>P. chinensis</i>	<i>L. donovani</i>	Chine
<i>P. dubosqi</i>	<i>L. major</i>	Sénégal
<i>P. longipes</i>	<i>L. aethiopica</i>	Éthiopie
<i>P. longicuspis</i>	<i>L. donovani infantum</i>	Algérie, Maroc, Tunisie
<i>P. major syriacus</i>	<i>L. donovani infantum</i>	Israël
<i>P. martini</i>	<i>L. donovani</i>	Kenya
<i>P. orientalis</i>	<i>L. donovani</i>	Soudan
<i>P. papatasi</i>	<i>L. major</i>	Arabie Saoudite, Israël, Russie
<i>P. pedifer</i>	<i>L. aethiopica</i>	Éthiopie, Kenya
<i>P. perniciosus</i>	<i>L. donovani infantum</i>	Malta, Tunisie, Maroc, Algérie
<i>P. salehi</i>	<i>L. tropica</i>	Inde
<i>P. sergenti</i>	<i>L. tropica</i>	Russie, Iraq
<i>P. tobbi</i>	<i>L. donovani infantum</i>	Chypre
<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	<i>L. mexicana amazonensis</i>	Brésil
<i>L. longipalpis</i>	<i>L. donovani chagasi</i>	Amérique du Sud, Amérique Centrale
<i>L. olmeca</i>	<i>L. mexicana mexicana</i>	Belize, Mexique
<i>L. trapidoi</i>	<i>L. braziliensis panamensis</i>	Panama
<i>L. umbratilis</i>	<i>L. braziliensis guyanensis</i>	Brésil, Mexique
<i>Psychodopygus wellcomei</i>	<i>L. braziliensis braziliensis</i>	Brésil

Un phlébotome porteur du parasite peut injecter des formes promastigotes dans la circulation d'un mammifère au cours d'un repas sanguin. Les promastigotes sont alors internalisés par des macrophages suite à un événement de phagocytose et le parasite se développe dans le lysosome de cette cellule. La différenciation de la forme promastigote à la forme amastigote qui a lieu pendant la phagocytose par le macrophage, fait suite à une exposition rapide du parasite à un environnement très acide (pH entre 4.5 et 6.0) (Chang & Dwyer, 1976; Zilberstein, 1993).

Les amastigotes s'accumulent dans le macrophage jusqu'à sa destruction (Faust & Russel, 1964). Le macrophage lysé libère un nombre important de parasites qui pourront envahir des cellules voisines. Les étapes suivantes de l'infection dépendent des espèces en cause (Chang *et al.*, 1985). Les parasites libérés dans la circulation peuvent également être ingérés par un phlébotome lors d'un repas sanguin subséquent; ce qui complète le cycle vital.

1.1.4. Pathogénèse

Un des aspects les plus intrigants des infections causées par *Leishmania* est la capacité du parasite à envahir les macrophages de l'hôte. Ces cellules sont équipées de façon à pouvoir éliminer les microorganismes étrangers et elles jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire de l'hôte (Benjamini & Leskowitz, 1991). Ainsi, les macrophages jouent un double rôle en servant à la fois de cellule hôte pour le parasite et de cellule régulatrice et effectrice de la réponse immunitaire des animaux infectés. Les parasites du genre *Leishmania* doivent de prime abord s'approcher et

s'attacher aux macrophages pour établir une infection. Des études menées en 1983 n'ont pu démontrer aucune évidence de chimiotactisme chez les promastigotes de *Leishmania mexicana* vis-à-vis des macrophages péritonéaux de souris (Bray, 1983b). Par contre, cette même étude a démontré que le parasite fixait le complément par une voie alternative. Sachant que l'activation du complément permet le recrutement de cellules phagocytaires au site d'infection, il est entendu que cet événement participe à l'augmentation du niveau de phagocytose du parasite par les macrophages. Les parasites attachés aux macrophages gagnent donc éventuellement le milieu intracellulaire (Chang, 1983). En raison de l'absence de pression sélective (la cellule hôte est déjà phagocytaire) le parasite ne semble pas avoir développé de mécanismes servant à l'invasion du macrophage. Par contre, certaines espèces de *Leishmania* peuvent infecter des cellules non phagocytaires tels que les fibroblastes humains de la peau par des mécanismes qui demeurent peu connus (Chang, 1978).

Puisque *Leishmania donovani* est un parasite intracellulaire obligatoire, sa survie dépend de sa capacité à résister aux différents facteurs microbicides du macrophage. La forme promastigote de *Leishmania* possède une couche de lipophosphoglycan (LPG) qui recouvre toute la surface du parasite, incluant le flagelle. Étant donné son abondance relative et sa localisation à la surface des cellules, le LPG interagit directement avec le milieu extracellulaire et contribue à la virulence du parasite. Plusieurs fonctions ont été proposées pour le LPG et certaines ont été démontrées (Turco & Descôteaux, 1992). Chez l'insecte vecteur, le LPG contrôle les interactions du promastigote avec les cellules épithéliales du système digestif. Chez

l'hôte mammifère, le LPG confère une certaine résistance aux dommages liés à l'activation du complément et peut également servir de molécule de reconnaissance pour l'attachement du parasite à la cellule hôte. Dans le phagolysosome, le LPG sert de barrière aux enzymes hydrolytiques. Il permet également l'élimination des métabolites toxiques de l'oxygène et il inhibe certaines fonctions du macrophage (Turco & Descôteaux, 1992). La forme amastigote (intracellulaire) ne possède pas de LPG à sa surface, suggérant que cette molécule joue un rôle important dans l'établissement de l'infection (Descôteaux *et al.*, 1994).

Un autre facteur-clé dans la survie intracellulaire est le maintien du pH intraparasitaire. Malgré le fait que les environnements intracellulaires et extracellulaires de *Leishmania* peuvent différer par un facteur pouvant atteindre jusqu'à 2 unités de pH, le pH intracellulaire du parasite demeure constant tout au long du cycle cellulaire (entre 6.8 et 7.4) (Zilberstein & Shapira, 1994). Cette homéostasie de pH est le résultat de l'activité d'une ATPase (H^+ -ATPase) membranaire dépendante du magnésium (Mg^{2+}) qui permet la translocation de protons. Cette pompe est par conséquent responsable de la création d'un gradient de protons transmembranaire (Zilberstein *et al.*, 1987; Zilberstein & Dwyer, 1988). Par ailleurs, une activité superoxyde dismutase a été trouvée chez *Leishmania donovani chagasi*, qui pourrait constituer un autre moyen pour le parasite de se défendre des métabolites toxiques de l'oxygène (O_2) présents dans le macrophage (Meshnick & Eaton, 1981). Les macrophages infectés quant à eux, sont réfractaires à l'action de l'interféron gamma

(INF- γ), leur sécrétion d'interleukine-1 (IL-1) est diminuée ainsi que leur expression des antigènes de classe II (Reed, 1995).

1.1.5. Pathologie

Les leishmanioses sont endémiques dans plusieurs pays du monde et atteignent au-delà de 12 millions de personnes avec 400 000 nouveaux cas par année (Ashford *et al.*, 1992). Les manifestations cliniques de ces infections dépendent en partie du statut de l'immunité de l'hôte (Chang *et al.*, 1985). Dans le cas des infections causées par les espèces *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica* et occasionnellement *Leishmania infantum* chez l'Homme, ces microorganismes se multiplient de façon localisée sur la peau, et sont à l'origine de l'apparition de lésions plus ou moins importantes. Ces infections sont appelées des leishmanioses cutanées. *Leishmania mexicana* et *Leishmania aethiopica* peuvent s'étendre à la surface de la peau pour causer la leishmaniose cutanée disséminée (Chang *et al.*, 1985). En ce qui concerne *Leishmania braziliensis* chez l'humain, le parasite forme des métastases dans les membranes muqueuses du nez et de la bouche et occasionne ce qu'on appelle une leishmaniose mucocutanée. *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* et *Leishmania chagasi* quittent la peau suite à une multiplication préliminaire et disséminent vers les macrophages des organes, en particulier ceux de la rate, du foie et de la moelle osseuse, causant ainsi la forme viscérale de l'infection (Chang *et al.*, 1985). La période d'incubation des infections causées par *Leishmania donovani* peut durer de dix jours à un an mais elle se limite généralement à quatre mois. Les symptômes d'une

leishmaniose viscérale sont essentiellement les suivants: malaise général, maux de tête, poussées de fièvre, inflammation de la rate et douleurs abdominales. La leishmaniose viscérale est mortelle dans 90% des cas si elle n'est pas traitée. La mort est souvent le résultat de complications suite à l'établissement d'infections secondaires (Faust & Russel, 1964).

1.1.6. Génétique de *Leishmania*

Le parasite du genre *Leishmania* possède un génome d'environ 50 Mb (mégabases) organisé en 25 à 30 chromosomes selon les espèces (Scholler *et al.*, 1986). Des études ont démontré que le parasite était diploïde mais quelques lignées aneuploïdes et tétraploïdes ont également été isolées (Iovannisci & Beverly, 1989; Cruz *et al.*, 1993). Le génome de *Leishmania* est composé à 12% de séquences très répétitives, à 13% de séquences modérément répétitives et le reste de séquences à simple copie (Scholler *et al.*, 1986). Sur le plan moléculaire, ces parasites et les trypanosomes apparentés sont d'autant plus intéressants en raison de la façon particulière qu'ils ont d'entreposer et d'exprimer leur information génétique. Chez les trypanosomes, les gènes codant pour des protéines sont dépourvus d'introns (Vanhamme & Pays, 1995). De plus, l'ADN de ces parasites n'est jamais condensé quelqu'en soit la morphologie ou le stade, malgré la présence d'un inventaire complet d'histones (Bender *et al.*, 1992; Hecker *et al.*, 1994). Dans le noyau, de longs pré-ARNm polycistroniques sont synthétisés par une ARN polymérase II. Ces transcrits sont par la suite modifiés afin d'obtenir des ARNm matures par une combinaison d'épissage en trans et de polyadénylation (Borst, 1986). De plus, très peu de

promoteurs ont été identifiés chez ces organismes (Vanhamme & Pays, 1995). Le contrôle de l'expression des gènes chez les trypanosomes se fait donc à un niveau post-transcriptionnel. La présence de séquences répétées pourrait, elle aussi, assurer une certaine régulation de l'expression des gènes. En même temps, elle constitue possiblement une façon de répondre aux mutations qui peuvent survenir pour des raisons diverses dans le génome (Chang *et al.*, 1985). Par ailleurs, certains gènes sont parfois relocalisés dans la région des opérons ribosomiaux suite à un événement de recombinaison, et sont donc transcrits par l'ARN polymérase I du parasite (Brown *et al.*, 1992; Chung *et al.*, 1992; Rudenko *et al.*, 1992). La traduction des transcrits synthétisés par l'ARN polymérase I est possible chez les trypanosomes à cause de l'épissage en trans au cours duquel de courtes séquences d'ARN (environ 35 nucléotides) appelées des « mini-exons » qui sont transcrites ailleurs dans le génome, sont ajoutées à l'extrémité 5' (à un site d'épissage précis) de tous les ARN messagers, dans une étape de maturation qui assure le transport, la stabilité et la traduction des transcrits (Murphy *et al.*, 1986; Sutton & Boothroyd, 1986). Ceci constitue également un autre moyen pour ces organismes de contrôler l'expression de leurs gènes puisque la polymérase I assure un niveau de transcription relativement important.

L'ADN mitochondrial (ADNk) compte pour 10 à 25% de l'ADN cellulaire total et forme un immense réseau composé de quelques douzaines de maxicercles (30 kb chacun) contenant des séquences d'ADN homologues à celles que l'on retrouve dans l'ADN mitochondrial d'autres eucaryotes, et d'environ 5000 minicercles (1 à 2 kb chacun) qui codent pour des petits ARN guides qui sont responsables de l'« editing »

des transcrits générés par les maxicercles (Simpson, 1973; England, 1981; Stuart & Feagin, 1992). Lors de l'« editing », les ARN guides font l'ajout ou la soustraction d'uraciles dans l'ARNm, ce qui en modifie le cadre de lecture (Benne, 1990; Simpson, 1990; Stuart & Feagin, 1992; Stuart *et al.*, 1997). L'« editing » est un processus de maturation post-transcriptionnelle des ARN messagers qui n'a, jusqu'à présent, été décrit que dans les kinétoplastes (Stuart *et al.*, 1997). Tous les cercles d'ADNk sont topologiquement liés les uns aux autres et ce réseau est présent en un seul exemplaire par cellule (Stuart & Feagin, 1992; Stuart *et al.*, 1997). Une dernière caractéristique importante de ces microorganismes est leur incapacité à synthétiser les purines (Chang *et al.*, 1985). Ils ont donc développé des moyens pour s'appropriier les purines de l'hôte. En 1984, Iovannisci *et al.* ont identifié deux systèmes de transport de nucléosides distincts dans la membrane de ces parasites.

1.1.7. Les traitements contre les leishmanioses

Les leishmanioses atteignent des millions d'individus à-travers le monde et l'incidence de ces infections est actuellement à la hausse pour plusieurs raisons dont l'augmentation du nombre de voyageurs dans les zones endémiques, les problèmes de contrôle des populations de vecteurs, l'absence de vaccins efficaces et le développement de résistance du parasite face aux différents traitements disponibles (Ouellette & Papadopoulou, 1993).

Depuis le début du siècle, les antimoines comptent parmi les traitements de choix dans la chimiothérapie de plusieurs formes de leishmanioses (Ouellette &

Papadopoulou, 1993). Depuis les cinquantes dernières années, les médecins ont recours aux antimoinés pentavalents (SbV) tels que le sodium stibogluconate (Pentostam) et le N-méthylglucamine (Glucantime) pour le traitement de ces infections, malgré la toxicité cardiaque et rénale, la difficulté d'administration et les coûts élevés de ces produits (WHO, 1984; Thakur, 1986). La pentamidine et l'amphotéricine B comptent parmi les traitements alternatifs mais ces composés n'ont pas un index thérapeutique comparable à celui des antimoinés pentavalents (SbV). De plus, ils nécessitent une thérapie à long terme et sont également toxiques (Bryceson *et al.*, 1985; Berman, 1988; Croft, 1988). Les bienfaits des traitements disponibles dans la chimiothérapie des leishmanioses sont donc limités, notamment à cause de leur faible spécificité, de leur toxicité excessive et de leurs coûts élevés. Dans plusieurs cas, ils sont inefficaces en raison du développement de résistance du parasite vis-à-vis ces composés (Ouellette & Papadopoulou, 1993).

1.2. LES ADN TOPOISOMÉRASES

1.2.1. La topologie de l'ADN

En 1953, Watson et Crick ont qualifié l'ADN (acide désoxyribonucléique) de molécule ayant la forme d'une double hélice. L'ADN est par contre loin de posséder une structure aussi uniforme que celle suggérée à l'époque. La conformation de l'ADN peut être décrite selon de nombreux paramètres qui définissent la double hélice (Dickerson R.E., 1989a et 1989b) et la structure d'une région d'ADN dépend de plusieurs facteurs dont la séquence nucléotidique (Sinden, 1994). La majorité des

molécules d'ADN en solution est orientée dans le sens des aiguilles d'une montre et adopte une conformation dite ADN-B. On compte 10,5 paires de bases par tour d'hélice dans une telle molécule. Une caractéristique importante de l'ADN-B est la présence d'un sillon majeur et d'un sillon mineur.

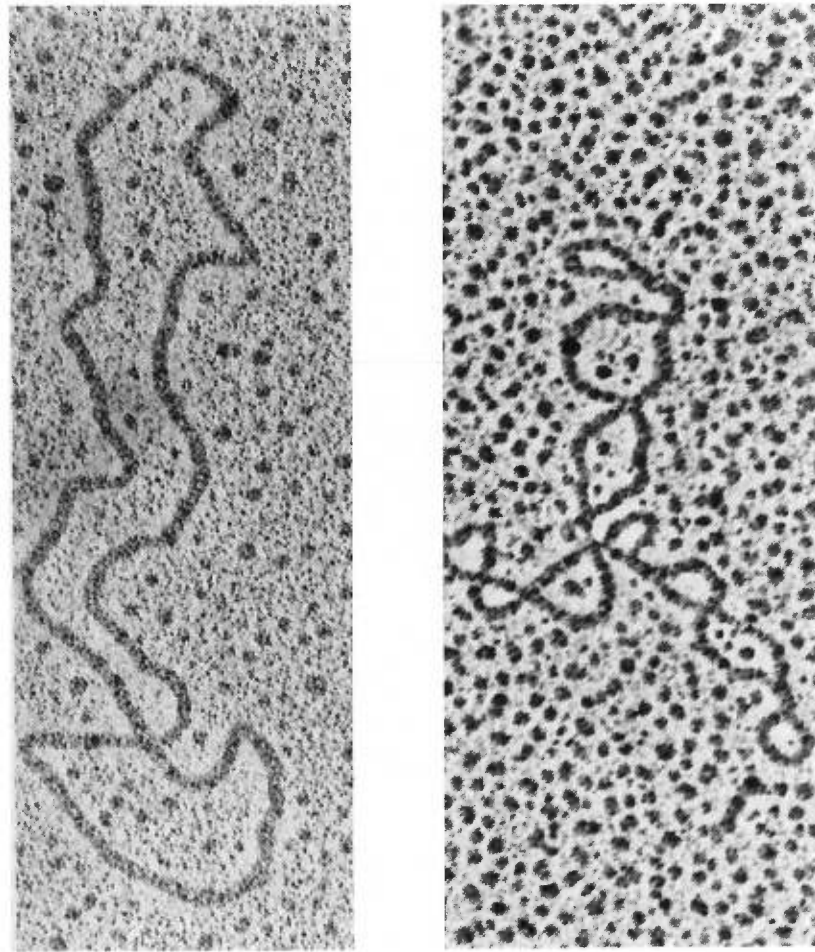


Figure 5. Topologie de l'ADN. Molécule d'ADN relaxée (à gauche) et surenroulée (à droite) tel qu'observé par microscopie électronique. La taille de cette molécule est approximativement de 10 000 paires de bases. Tiré de Liu, 1994a.

La structure de la double hélice devient d'autant plus intrigante si l'on considère que l'ADN de la plupart des organismes existe sous forme surenroulée. Le terme surenroulé désigne l'état d'une double hélice qui est enroulée autour d'elle-même (Sinden, 1994) (voir figure 5 de la page 17). Le surenroulement est une propriété importante des chromosomes, qu'ils soient circulaires comme chez les bactéries, ou linéaires comme dans les cellules eucaryotes. Si l'ADN est surenroulé dans le sens inverse à son hélicité, on dit qu'il est surenroulé négativement. Il en résulte un nombre plus élevé de paires de bases par tour d'hélice. Au contraire, si l'ADN est surenroulé dans le même sens que son hélicité, on compte alors un nombre inférieur de paires de bases par tour d'hélice, et on dit de cette molécule qu'elle est surenroulée positivement. La plupart des molécules d'ADN dans leur état naturel (incluant les chromosomes et les plasmides), chez les bactéries autant que chez les eucaryotes, est présente sous forme surenroulée négativement (Sinden, 1994).

1.2.2. Définition et rôles des ADN topoisomérases

Les topoisomérases sont des enzymes qui modifient le surenroulement de la double hélice en introduisant des cassures transitoires dans les liens phosphodiester de l'ADN par des réactions de transestérification (Liu, 1994a). Les étapes principales de ce type de réaction sont présentées à la figure 6 de la page 19. Essentiellement, un groupement hydroxyl (OH) du site actif (résidu tyrosine) initie une attaque nucléophile au niveau d'un lien phosphodiester du squelette de la double hélice. Le résultat en est la cassure de l'ADN et simultanément, formation d'un lien phosphotyrosine. Dans cette réaction, la topoisomérase devient liée à l'ADN de façon

covalente. Ces liaisons covalentes peuvent se faire avec les extrémités 3' ou 5' libres des cassures selon le type de topoisomérase qui participe à la réaction. Une double hélice ou l'un des brins de cette double hélice peut traverser cette cassure, résultant ainsi en l'interconversion des isomères topologiques ou topoisomères. Une seconde

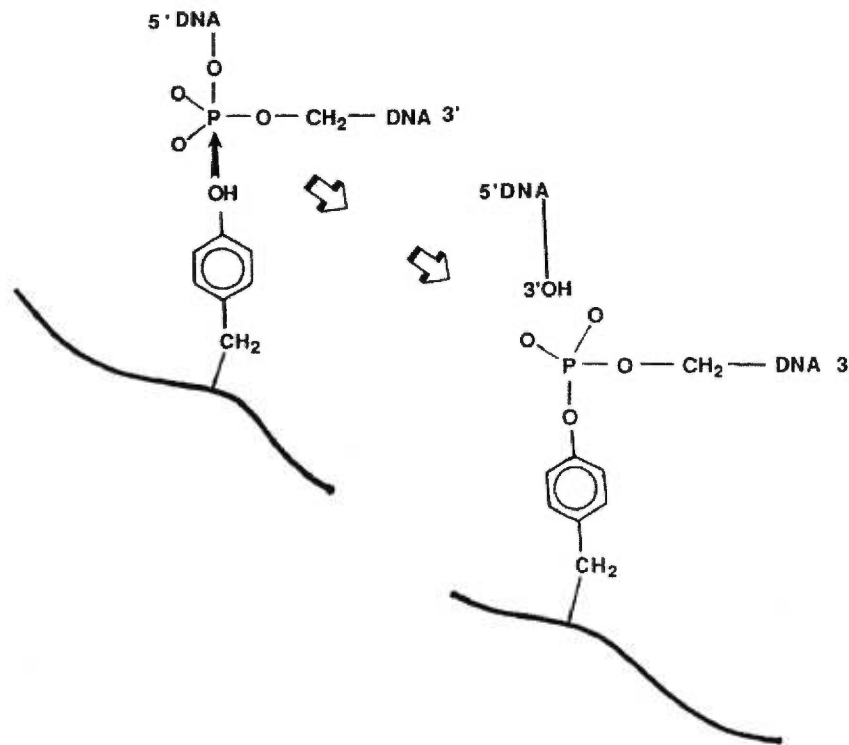


Figure 6. Réaction de transestérification. Tiré de Liu, 1994a.

attaque nucléophile est ensuite initiée, cette fois-ci par le groupement OH du désoxyribose de l'extrémité libre de la cassure, sur le lien phosphotyrosine issu de la première étape. Cette réaction a pour conséquence de rejoindre les deux extrémités de la cassure rétablissant l'intégrité de la molécule d'ADN, et de libérer l'enzyme afin qu'elle soit recyclée. Dans certains cas, les topoisomérases nécessitent la présence d'ATP (adénosine triphosphate) comme source d'énergie pour la réalisation de leurs activités (Liu, 1994a).

Toutes les réactions biologiques impliquant l'ADN nécessitent probablement la participation des topoisomérases. Ces enzymes jouent des rôles importants dans les différentes étapes de la réplication (Kornberg & Baker, 1992; Liu, 1994a; Wang, 1996; Huang *et al.*, 1998) et de la transcription (Liu & Wang, 1987; Wu *et al.*, 1988; Tsao *et al.*, 1989; Kornberg & Baker, 1992; Liu, 1994a; Wang, 1996;). Par exemple, suite à la réplication chez les bactéries comme *Escherichia coli*, les deux chromosomes circulaires sont interreliés de façon caténaire. Une topoisomérase est nécessaire pour assurer le passage d'une des molécule d'ADN double brin au-travers de l'autre, permettant ainsi la séparation et la ségrégation des chromosomes dans les deux cellules filles (Kornberg & Baker, 1992; Liu, 1994a; Wang, 1996; Huang *et al.*, 1998). Par ailleurs, lors de la transcription, le mouvement de l'ARN polymérase génère des tensions dans l'ADN (Liu & Wang, 1987; Wu *et al.*, 1988; Tsao *et al.*, 1989). Les topoisomérases sont requises pour éliminer ces tensions, sans quoi les complexes de transcription (et les fourches de réplication également) seraient considérablement ralentis; il pourrait également y avoir formation d'hybrides ADN-ARN (Drolet *et al.*, 1995; Massé *et al.*, 1997; Phoenix *et al.*, 1997). De même, les topoisomérases sont nécessaires au maintien du niveau de surenroulement de l'ADN chez les bactéries; ce dernier pouvant influencer l'expression de certains gènes (Liu, 1994a).

1.2.3. Classification des ADN topoisomérases

Les ADN topoisomérases peuvent essentiellement être divisées en deux grandes classes, soient les ADN topoisomérases de type I et les ADN topoisomérases de type II. Les topoisomérases de type I peuvent être subdivisées en deux groupes: les

topoisomérase IA (procaryote) et les topoisomérase IB (eucaryote) (Wang, 1996). Ces enzymes introduisent une cassure dans un seul des deux brins de l'ADN, et modifient ainsi sa topologie, un tour à la fois. Les topoisomérase de type II comprennent la gyrase procaryote, la topoisomérase II et la topoisomérase IV. Les topoisomérase de type II brisent les deux brins de la double hélice et altèrent le surenroulement de l'ADN, deux tours à la fois (Wang, 1996). La classification des différentes topoisomérase connues et leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau II de la page 22.

1.2.3.1. La topoisomérase de type I procaryote

Le premier membre connu de la famille des topoisomérase a été partiellement purifié d'extraits cellulaires de la bactérie *Escherichia coli* en 1971 par James Wang. Ce dernier avait observé que cette protéine de 97 kDa (appelée ω à l'époque) relaxait spécifiquement l'ADN surenroulé négativement. Cette topoisomérase I est indépendante de la présence de cofacteurs pour son activité (par exemple, l'ATP ou le NAD). Elle nécessite par contre la présence de magnésium (Mg^{2+}) (Wang, 1971). Les topoisomérase I procaryotes modifient la topologie de molécules d'ADN par une réaction qui peut être subdivisée en quatre étapes, soit 1) la liaison non covalente de l'enzyme à un substrat d'ADN double brin surenroulé négativement 2) coupure d'un des brins de la double hélice pour former un intermédiaire appelé le complexe clivé où la topoisomérase est liée de façon covalente à l'ADN par un lien 5'-phosphotyrosyl 3) rotation de la double hélice autour de la cassure introduite par la topoisomérase I, pendant que cette dernière sert de pivot pour les brins impliqués et 4) ligation des

Tableau II: Classification et propriétés des topoisomérases. Inspiré de Sinden, 1994

Enzyme	Type	Taille (kDa)	Cofacteurs	Activités
Procaryote (IA)				
<i>E. coli</i>				
Topoisomérase I	I	97	Mg ²⁺	relaxe l'ADN surenroulé négativement
Gyrase	II	105 (GyrA) 95 (Gyr B)	ATP, Mg ²⁺	introduit des supertours négatifs(ATP-dépendant); relaxe l'ADN surenroulé positivement et négativement (ATP-indépendant)
Topoisomérase III	I	73,2	Mg ²⁺	relaxe l'ADN surenroulé négativement
Topoisomérase IV	II	75 (ParC) 70 (ParE)	ATP, Mg ²⁺	relaxe l'ADN surenroulé positivement et négativement; décaténation
Eucaryote (IB)				
Levure				
Topo I	I	90	-----	relaxe l'ADN surenroulé positivement et négativement
Topo II	II	164	ATP, Mg ²⁺	relaxe l'ADN surenroulé positivement et négativement
Topo III	I	74	Mg ²⁺	relaxe partiellement l'ADN surenroulé négativement; besoin d'ADN simple brin.

extrémités libres de l'ADN pour restaurer le lien phosphodiester initial. La topoisomérase I procaryote reconnaît et se lie à la jonction d'ADN simple brin et double brin (Wang, 1996). Elle interagit avec la double hélice à la manière d'un pont et relie les deux extrémités de la cassure, permettant ainsi la relaxation de l'ADN, un

tour à la fois. Les différentes étapes du mécanisme de relaxation de la topoisomérase I de *E. coli* sont présentées à la figure 7. La situation est un peu différente chez les eucaryotes.

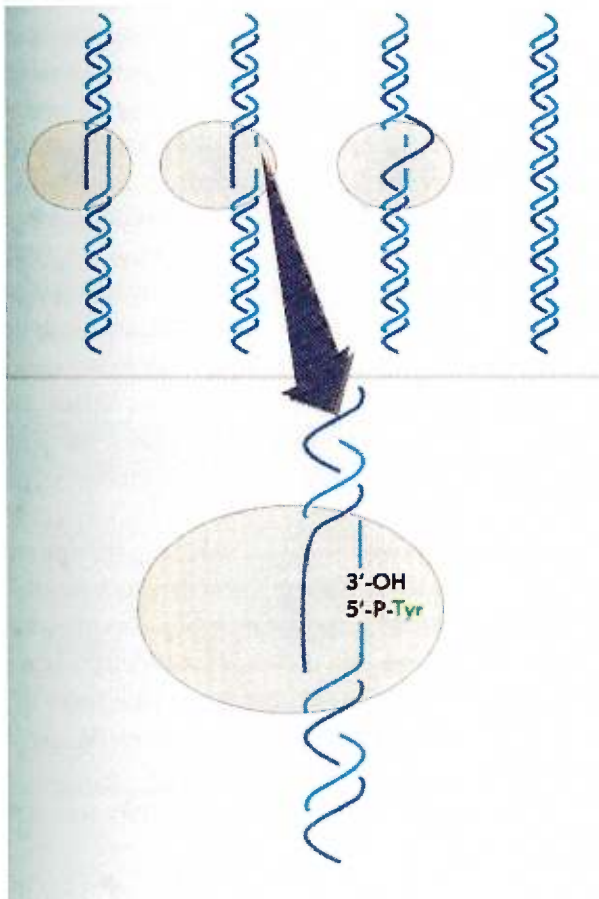


Figure 7. Les quatre étapes du mécanisme de relaxation de l'ADN par la topoisomérase I procaryote : 1) liaison non covalente de l'enzyme avec la double hélice, 2) coupure de l'ADN et formation d'un lien covalent entre l'enzyme et l'extrémité 5' libre de la cassure par l'intermédiaire de la tyrosine du site actif, 3) passage d'un brin de la double hélice et 4) restauration du lien phosphodiester initial. Tiré de Lewin, 1994.

1.2.3.2. La topoisomérase de type I eucaryote

Peu de temps après la découverte de la protéine ω chez *E. coli*, soit en 1972, une activité pouvant relaxer l'ADN surenroulé négativement et positivement a été détectée dans des extraits cellulaires de souris (Champoux & Dulbecco, 1972). La topoisomérase I eucaryote utilise de préférence un substrat d'ADN double brin. Elle peut relaxer l'ADN en absence de cofacteurs (ATP, par exemple) et en présence d'EDTA, mais le Mg^{2+} stimule son activité (Champoux & Dulbecco, 1972). Les différentes étapes de la réaction de relaxation sont essentiellement les mêmes que pour son homologue procaryote (voir figure 7 de la page 23). Par contre, dans le cas de la topoisomérase I eucaryote, le complexe clivé est formé avec l'extrémité 3' libre de la cassure. De plus, la topoisomérase I eucaryote n'agit pas à la manière d'un pont, mais plutôt à celle d'un étau qui serre et qui relâche la double hélice. Ceci permet la relaxation de l'ADN de plusieurs tours par réaction (Redinbo *et al.*, 1998). Les topoisomérases I procaryotes et eucaryotes démontrent des séquences, des structures et des propriétés réactionnelles distinctes (Wang, 1996). Les topoisomérases I eucaryotes sont monomériques et leur taille varie généralement entre 90 et 135 kDa (Wang, 1996). L'enzyme virale de *Vaccinia* est la plus petite topoisomérase I connue avec un un poids moléculaire de 33 kDa (Shuman *et al.*, 1988).

1.2.3.3. Les topoisomérases de type II

Les topoisomérases de type II modifient également la topologie de l'ADN. Certaines topoisomérases II appelées gyrases, sont les seules enzymes connues qui soient capables d'introduire des supertours négatifs dans l'ADN. Cette réaction

nécessite une hydrolyse d'ATP. Les gyrases ont été identifiées chez les procaryotes et aucun équivalent eucaryote n'a jusqu'à date été décelé (Sinden, 1994). La gyrase de *E. coli* a été découverte en 1976 (Gellert *et al.*, 1976). Les autres membres de cette famille altèrent la topologie de l'ADN sans toutefois posséder la capacité d'introduire des supertours dans la double hélice. Chez les procaryotes, une topoisomérase de type II appelée la topoisomérase IV est impliquée dans la ségrégation des chromosomes à la fin de la réplication (Huang *et al.*, 1998). Chez les eucaryotes, cette activité est réalisée par la topoisomérase II (Wang, 1996). Les topoisomérases II chez les eucaryotes ont des structures et propriétés biochimiques semblables à celles des procaryotes. Ce sont des homodimères dont la taille des sous-unités varie entre 150 et 190 kDa. Ces enzymes relaxent l'ADN surenroulé négativement et positivement, mais contrairement à la gyrase procaryote, ne peuvent introduire des supertours dans la double hélice (Wang, 1996). Les topoisomérases II catalysent des transformations topologiques en introduisant des cassures transitoires double brin dans l'ADN (Liu *et al.*, 1980). Une seconde double hélice peut alors traverser cette ouverture et modifier le niveau de surenroulement de l'ADN. Les deux extrémités de la cassure sont ensuite raboutées pour rétablir l'intégrité du premier segment. Ces enzymes nécessitent la présence d'ATP et de Mg^{2+} pour la réalisation de ces activités (Wang, 1996). Les topoisomérases II semblent constituer un groupe d'enzymes beaucoup plus homogène quelqu'en soit la source (procaryote, eucaryote ou virale), contrairement aux topoisomérases de type I qui diffèrent considérablement selon l'organisme, non seulement en terme de leurs structures, mais également par leurs caractéristiques

réactionnelles (Huang, 1986; Lynn *et al.*, 1986; Uemura *et al.* 1986; Wyckoff *et al.*, 1989).

1.2.4. Analyse de séquence et de structure de la topoisomérase I eucaryote

Le séquençage des gènes codant pour la topoisomérase IB de plusieurs organismes a été initié il y a maintenant plus d'une dizaine d'années. L'accumulation et l'alignement de ces séquences a permis de déduire des motifs conservés, d'étudier leur importance pour l'activité des topoisomérases, et de faciliter les études biochimiques et structurelles de ces enzymes.

L'activité catalytique des topoisomérases est conférée par un résidu tyrosine (Wang, 1996). Chez les membres de la famille IB, cette tyrosine est localisée à l'intérieur d'un élément de séquence commun Ser-Lys-X-X-Tyr (SKXXY), situé près de l'extrémité C-terminale de la protéine (Champoux, 1981; Eng *et al.*, 1989; Lynn *et al.*, 1989; Shuman *et al.*, 1989). Même si les acides aminés histidine et cytosine ont déjà été suggérés, aucun résidu catalytique autre que la tyrosine n'a jusqu'à date été identifié (Wang, 1996).

La topoisomérase I humaine est organisée en quatre principaux domaines: un domaine N-terminal de 24 kDa très chargé comprenant quatre signaux de localisation nucléaire (approximativement, résidus 1 à 197), un domaine de 54 kDa (environ résidus 198 à 651) appelé le noyau (ou « core ») de la protéine, une région charnière (« linker ») de 3 kDa (approximativement, résidus 652 à 696) dont la séquence et la

longueur peuvent varier énormément d'un organisme à l'autre; et un domaine C-terminal de 10 kDa contenant le site actif tyrosine à la position 723 (environ résidus 697 à 765) (Stewart *et al.*, 1996). Il a été démontré que le noyau central et le domaine C-terminal sont nécessaires et suffisants pour conférer l'activité à la topoisomérase I humaine (Stewart *et al.*, 1996; Stewart *et al.*, 1997; Champoux, 1998). L'organisation est essentiellement la même chez les autres représentants de la famille des topoisomérase IB, quoi que la taille des différents domaines peut varier d'une enzyme à l'autre.

Des études récentes avec une topoisomérase I reconstituée (noyau et domaine C-terminal) ont permis de déterminer la structure cristallographique de l'enzyme liée à son substrat (Redinbo *et al.*, 1998). Cette dernière est présentée à la figure 8 de la page 28. Le noyau de l'enzyme qui s'associe avec le domaine C-terminal pour former une protéine de 64,3 kDa active, peut être subdivisé en trois sous-domaines. Le sous-domaine I (résidus 215 à 232 et 320 à 433) contient 2 hélices α et 9 feuillets β . Le sous-domaine II qui s'étend des acides aminés 233 à 319 comprend 5 hélices α et 2 feuillets β . Ces deux sous-domaines interagissent pour former la partie supérieure (ou « cap ») de l'enzyme. Finalement, le sous-domaine III (des positions 434 à 635) est composé de 10 hélices α et de 3 feuillets β . Celui-ci comprend tous les acides aminés importants pour la réaction sauf le site actif Y⁷²³, et forme une région charnière ou une articulation qui s'ouvre et qui se referme autour de la double hélice. Les sous-domaines I et III interagissent en l'unique point de contact entre les parties supérieures et inférieures de l'enzyme. Le noyau s'associe au domaine C-terminal par l'intermédiaire

des hélices α 8, 16 et 17 du sous-domaine III. Le domaine C-terminal s'étend des positions 713 à 765 et comprend 5 hélices α et le site actif (Y^{723}) (Redinbo *et al.*, 1998). La protéine reconstituée se replie de sorte qu'il existe un pore central d'un

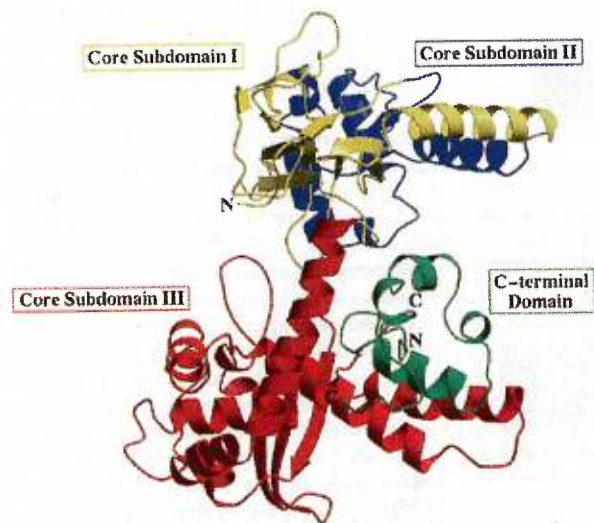


Figure 8. Structure cristallographique de la topoisomérase I humaine reconstituée. Le noyau et le domaine C-terminal s'associent pour former une protéine de 64,3 kDa fonctionnelle. Tiré de Redinbo *et al.*, 1998.

diamètre de 15 à 20 angströms où l'on retrouve des résidus principalement chargés positivement. Le site actif est également situé à l'intérieur de ce canal chargé positivement (Redinbo *et al.*, 1998). C'est à l'intérieur de cette ouverture que se positionne la double hélice d'ADN. Les interactions avec l'ADN se font principalement via les sous-domaines I et III du noyau de l'enzyme, qui se replient autour de la double hélice. Les interactions impliquant le sous-domaine II et le domaine C-terminal sont limitées. Le feuillet β 11 du sous-domaine I du noyau de la topoisomérase I est positionné dans le sillon majeur de la l'ADN à l'opposé du site de clivage (Redinbo *et*

al., 1998). La majorité des acides aminés près du site de clivage interagissent avec l'ADN par l'intermédiaire des groupements phosphates de la double hélice. Il existe un total de 27 points de contact (distance inférieure à 3,5 angströms) entre la topoisomérase I et l'ADN dans un complexe clivé (complexe formé lorsque l'enzyme est liée de façon covalente à l'ADN) et 24 acides aminés sont impliqués dans ces interactions. Contrairement à la topoisomérase I du virus de la vaccine, les topoisomérases I eucaryotes ne semblent pas reconnaître de séquences particulières (Redinbo *et al.*, 1998). En réalité, un seul contact entre l'enzyme et la double hélice démontre une spécificité de base: un lien hydrogène dans le sillon mineur entre la lysine 532 (K⁵³²) et l'oxygène O-2 carbonyle d'une base thymidine à la position-1 par rapport au site de clivage. La thymidine est la seule base nucléotidique dont les paires d'électrons (de l'atome O-2) soient libres pour accepter un lien hydrogène du groupement ϵ -amino de la K⁵³² (Redinbo *et al.*, 1998).

1.2.5. Autres activités de la topoisomérase I eucaryote

En modifiant le niveau de surenroulement de la double hélice, les topoisomérases jouent un rôle important dans plusieurs processus biologiques impliquant l'ADN. Dernièrement, des études ont également permis de mettre en évidence des activités de la topoisomérase I qui s'ajoutent à celle de relaxation.

En 1994, Yeh *et al.* ont démontré que la topoisomérase I humaine introduisait des cassures dans l'ADN au niveau de bases mal appariées (ou agencements erronés). Puisque ces bases mal appariées sont adjacentes au site de clivage, l'étape de ligation

des extrémités d'ADN par l'enzyme est considérablement ralentie et il en résulte une augmentation du taux de complexes clivés. Par l'intermédiaire de cette activité de la topoisomérase, les sites où l'on retrouve des agencements erronés non réparés constituent des « hot spots » de recombinaison (Yeh *et al.*, 1994).

Les rôles des topoisomérases dans la recombinaison sont très nombreux (Kornberg & Baker, 1992; Liu, 1994a, Wang, 1996). Des études avec la topoisomérase I du virus de la vaccine ont démontré que celle-ci pouvait résoudre des jonctions de Holliday (Sekiguchi *et al.*, 1996). Ces structures intermédiaires de la recombinaison sont, de façon générale, coupées par des endonucléases. Cette même fonction peut donc être réalisée par une topoisomérase IB par l'intermédiaire de réactions de transestérification (Sekiguchi *et al.*, 1996). Les topoisomérases participent également à des événements de recombinaison dite illégitime (Zhu & Schiestl, 1996). En coupant l'ADN chromosomique des cellules, des topoisomérases voisines rejoignent parfois les extrémités de molécules distinctes, catalysant ainsi une sorte d'échange de brins lors de la ligation.

Puisqu'elles partagent le même mécanisme d'action, c'est-à-dire coupure de l'ADN par une réaction de transestérification via un site actif tyrosine et formation d'un lien covalent avec l'extrémité 3' de la cassure, les topoisomérases I eucaryotes et les recombinases à spécificité de site sont depuis longtemps étudiées et comparées, dans le but d'identifier d'autres caractéristiques communes. A première vue, les séquences de ces deux familles d'enzymes ne semblent démontrer aucune similarité autre que le site

actif lui-même. Mais une analyse plus poussée démontre bien que ces deux familles d'enzymes ont d'avantage en commun que ce dont leurs séquences suggèrent (Cheng *et al.*, 1998; Sherrat & Wigley, 1998). Des études récentes sur les structures cristallographiques de la topoisomérase I humaine reconstituée et de la recombinaise à spécificité de site phagique HP1, ont démontré que celles-ci étaient presque parfaitement superposables et qu'il y avait donc un niveau de similarité important entre les structures tridimensionnelles de la topoisomérase I du virus de la vaccine et de la recombinaise à spécificité de site HP1 (Redinbo *et al.*, 1998).

De plus, il a été démontré dernièrement que la topoisomérase I du virus de la vaccine, qui de par sa petite taille semble être le prototype idéal pour toutes les topoisomérases IB, possède une activité ribonucléasique de type H (Sekiguchi & Shuman, 1997). Cette activité dégrade la partie ARN d'un hybride ADN-ARN. La réaction a lieu via une transestérification sur un substrat d'ADN contenant un ou plusieurs ribonucléotides. Aucun rôle biologique n'a cependant été attribué à cette activité. Il est entendu que les topoisomérases participent à de nombreux processus biologiques impliquant l'ADN mais leurs multiples rôles dans la cellule résultent de nombreuses propriétés qui s'ajoutent à leur activité de relaxation.

1.3. LES POISONS ANTI-TOPOISOMÉRIASE I

1.3.1. Les familles de composés anti-topoisomérase I

Il existe essentiellement deux grandes familles de composés anti-topoisomérase I: les composés qui lient le complexe clivé et les composés qui lient l'ADN (Chen & Liu, 1994). Cette section se rapporte à l'effet de ces drogues sur la topoisomérase I eucaryote (IB). Bien que les topoisomérases I procaryotes et eucaryotes partagent une activité de relaxation de l'ADN, celles-ci diffèrent considérablement à bien des niveaux dont leur sensibilité à ces composés (Drlica & Franco, 1988; Chen & Liu, 1994).

1.3.1.1. Les composés qui lient le complexe clivé

Le complexe clivé formé de la topoisomérase I et de l'ADN est l'intermédiaire covalent de la réaction de relaxation de l'enzyme et celui-ci est réversible (Wang, 1996). Dans une réaction de relaxation, le complexe clivé est en équilibre avec un complexe non clivé, c'est-à-dire le complexe (non covalent) formé de l'enzyme et de la double hélice avant l'introduction d'une cassure dans l'ADN (Wang, 1996). Les poisons anti-topoisomérase I de cette famille perturbent cet équilibre en favorisant l'accumulation de complexes clivés par rapport à celle des complexes non clivés (Drlica & Franco, 1988; Chen & Liu, 1994; Liu, 1994a et 1994b). En d'autres termes, ces drogues entravent l'étape de ligation des extrémités de l'ADN, retardant ainsi la réparation de la cassure. Les topoisomérases étant requises pour la progression des fourches de réplication, la collision entre une de celles-ci et un complexe clivé stabilisé serait donc une éventualité en présence de ces composés. Une telle rencontre a pour

conséquence la formation de cassures double brin dans l'ADN (Hsiang *et al.*, 1985; Drlica & Franco, 1988; Covey *et al.*, 1989; Hsiang *et al.*, 1989; D'arpa *et al.*, 1990; Chen & Liu, 1994; Liu, 1994a et 1994b; Wang, 1996). C'est l'accumulation de ces cassures double brin non réparées qui mène éventuellement à la mort cellulaire. Le mécanisme d'action de cette famille de poisons est présenté à la figure 9.

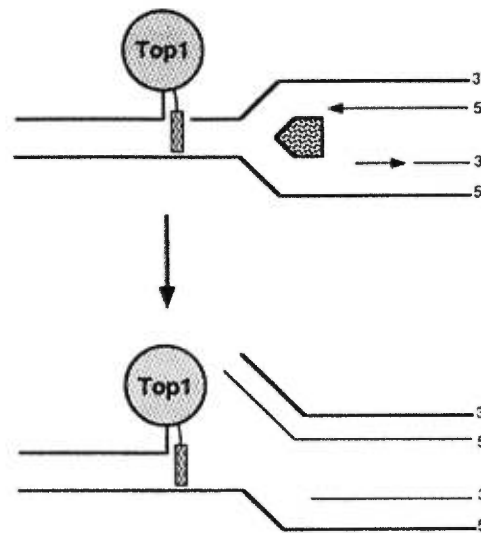


Figure 9. Mécanisme d'action des composés qui lient le complexe clivé. Le poison (rectangle) se lie au complexe clivé formé de la topoisomérase I (cercle) en association avec l'ADN. La collision d'une fourche de réplication (pentagone) avec le complexe clivé stabilisé résulte en l'introduction d'une cassure double brin dans l'ADN. Tiré de Liu, 1994b.

1.3.1.1.1. La camptothécine: un alcaloïde d'origine végétale

La camptothécine a été isolée par Wall *et al.* en 1966 d'un arbre *Camptotheca acuminata*. On avait observé que ce composé avait des propriétés anti-tumorales dans les modèles animaux, surtout dans des cas de cancer du colon, ce qui mena à des

essais cliniques dans les années 1970 (Liu, 1994b). La forme lactone de la camptothécine étant peu soluble, les chercheurs se sont donc tournés vers la forme à cycle ouvert (camptothécine, NSC-100880) (Gottlieb *et al.*, 1970; Muggia *et al.*, 1972). Ces essais ont rapidement été interrompus en raison de la toxicité excessive du composé (Muggia *et al.*, 1972). Les effets cellulaires de la camptothécine ont également été étudiés. La camptothécine inhibe la synthèse de l'ADN et de l'ARN (Bosmann, 1970; Horwitz *et al.*, 1971a et 1971b; Kessel, 1971; Wu *et al.*, 1971; Abelson & Penman, 1972; Kessel *et al.*, 1972). Cette inhibition est réversible pour l'ARN tandis qu'elle devient irréversible pour l'ADN à haute concentration de camptothécine (Horwitz *et al.*, 1971a; Kessel, 1971). De plus, la camptothécine est spécifiquement cytotoxique pour les cellules en phase S et elle provoque un arrêt des cellules en phase G₂ (Li *et al.*, 1972; Horwitz & Horwitz, 1973). Finalement, ce composé cause la fragmentation de l'ADN génomique des cellules (Horwitz *et al.*, 1971a et 1971b; Drlica & Franco, 1988; Chen & Liu, 1994; Liu, 1994b). La topoisomérase I est la seule cible moléculaire de la camptothécine dans les cellules, ce qui explique plusieurs de ses effets (Drlica & Franco, 1988; Hsiang & Liu, 1988; Chen & Liu, 1994; Liu, 1994b). De nombreux dérivés de la camptothécine dont le topotecan ont également été synthétisés (Wani *et al.*, 1987) et sont à des stades différents du développement clinique.

1.3.1.1.2. La sensibilité aux composés liant le complexe clivé chez *L. donovani*

En 1993, une activité topoisomérase I a été isolée dans des extraits cellulaires du parasite *Leishmania donovani* par Chakraborty *et al.* mais le gène codant pour

cette enzyme n'a toujours pas été isolé. Cette topoisomérase I purifiée de 67 kDa semble catalyser la relaxation dépendante du magnésium (Mg^{2+}) d'une matrice d'ADN surenroulée négativement seulement (Chakraborty *et al.*, 1993). Ceci diffère des autres topoisomérases I eucaryotes qui ne sont aucunement spécifiques au type de surenroulement de la matrice ADN (Wang, 1996). Des études menées en 1995 ont démontré que le parasite *L. donovani* était sensible à la camptothécine, un composé qui stabilise les complexes clivés (Bodley & Shapiro, 1995a). Ces études soutiennent l'hypothèse que la topoisomérase I des trypanosomes est une cible moléculaire envisageable dans le développement de chimiothérapies antiprotozoaires.

1.3.1.2. Les composés qui lient l'ADN

Certaines molécules appelées MGBLs (« Minor Groove-Binding Ligands ») ont la propriété de se lier au sillon mineur de l'ADN. Ces composés sont spécifiques à des régions qui sont riches en AT (adénosine et thymidine) et provoquent un élargissement du sillon mineur (Neidle *et al.*, 1987; Gilbert & Feigon, 1991; Chen *et al.*, 1993a et 1993b). Ces molécules constituent la deuxième classe de composés qui ciblent la topoisomérase I (Chen *et al.*, 1993a et 1993b). Par leur liaison à l'ADN, ces drogues désalignent en quelque sorte les deux extrémités de la cassure générée lors de la formation du complexe clivé, entravant ainsi la ligation de l'ADN par l'enzyme. Une situation semblable à la précédente peut alors se produire, soit la collision d'une fourche de réplication avec un complexe clivé ouvert ayant pour conséquence la fragmentation du génome par l'accumulation de cassures double brin dans l'ADN (Chen *et al.*, 1993a et 1993b; Chen & Liu, 1994; Liu, 1994a;).

1.3.1.2.1. Les benzimidazoles

Il existe deux groupes de benzimidazoles qui présentent une activité anti-topoisomérase I: les bibenzimidazoles (Kim *et al.*, 1996) et les terbenzimidazoles (Sun *et al.*, 1995). Les bibenzimidazoles comprennent les colorants Hoechst: le Ho33342 et le Ho33258. Ces deux composés ont des activités anti-topoisomérase I équivalentes *in vitro* mais puisque le Hoechst 33342 a une plus grande perméabilité due à une substitution d'un groupement éthoxy sur le cycle 4-phényl par comparaison avec le Hoechst 33258, il est deux fois plus cytotoxique que le Ho33258 (Chen *et al.*, 1993b). Parmi les terbenzimidazoles, le 5-n-propyl-terbenzimidazole et certains de ses dérivés sont également des poisons anti-topoisomérase I (Sun *et al.*, 1995; Pilch *et al.*, 1997).

1.3.1.2.2. La sensibilité aux MGBLs chez *L. donovani*

Plusieurs composés classiques utilisés dans le traitement des maladies parasitaires causées par des trypanosomes sont des drogues qui lient l'ADN (Liu, 1994b; Burri *et al.*, 1996). Parmi les plus connus, on compte le diminazine acéturate (bérénil), la pentamidine et le bromure d'éthidium (Hadjuk, 1978; Chen *et al.*, 1993a; Liu, 1994b). Ces composés ne provoquent pas une fragmentation de l'ADN dans les cellules de mammifères mais ils stabilisent les complexes clivés dans les mini-cercles des trypanosomes par l'intermédiaire de la topoisomérase (Hadjuk, 1978). Puisque l'ADNk n'est pas essentiel à la survie de certains parasites, la topoisomérase I nucléaire des trypanosomes constitue une meilleure cible cellulaire dans le traitement de ces infections et de nombreux laboratoires se penchent sur le développement de nouvelles drogues antiparasitaires spécifiques à cette dernière (Liu, 1994b; Burri *et al.*, 1996).

Certaines études ont démontré un lien direct entre l'accumulation de complexes clivés stabilisés (activité anti-topoisomérase) et l'activité antiparasitaire de divers composés (Werbovetz *et al.*, 1992; Werbovetz *et al.*, 1994; Bodley *et al.*, 1995a et 1995b). Pour les composés évalués, il existe une corrélation entre la formation de complexes clivés « ouverts » et la cytotoxicité (Bodley *et al.*, 1995b). De plus, des analyses sur des topoisomérases I de mammifères et du parasite suggèrent qu'il existe des différences exploitables entre les deux (Douc-Rasy *et al.*, 1984; Chakraborty & Mujumder, 1988; Bodley *et al.*, 1995b; Obexer *et al.*, 1995). Ces différences peuvent fournir une base pour l'établissement d'une toxicité sélective contre ces parasites, une caractéristique d'importance évidente dans le développement de thérapies antiparasitaires.

1.3.2. La résistance aux composés anti-topoisomérase I

L'identification des ADN topoisomérases comme cibles moléculaires de plusieurs drogues a permis une conception plus rationnelle de thérapies destinées au traitement de certains cancers. Par contre, un des obstacles importants dans la réalisation de cet objectif est l'émergence de lignées cellulaires qui sont résistantes à ces composés (Andoh *et al.*, 1987; Sugimoto *et al.*, 1990; Tamura *et al.*, 1990; Kubota *et al.*, 1992; Benedetti *et al.*, 1993). La compréhension des mécanismes de résistance aux médicaments est importante à trois niveaux: pour développer des outils de détection précoce de la résistance, pour suggérer de nouvelles utilisations d'agents chimiothérapeutiques et pour trouver de nouvelles cibles afin de développer la recherche de nouveaux agents antiparasitaires (Ouellette *et al.*, 1997).

1.3.2.1 Les mécanismes de résistance aux drogues anti-topoisomérase I

De façon générale, les composés visant à traiter des maladies ou infections quelconques agissent directement sur leur cible cellulaire, la séquestrant ou l'inactivant, de sorte que la cellule cible est dépourvue d'une activité essentielle et meurt. Contrairement à ceux-ci, le mécanisme d'action des deux familles de composés anti-topoisomérase I présentées ci-haut, n'est pas l'inhibition de l'activité catalytique de la topoisomérase. Au contraire, ces drogues exploitent la capacité de l'enzyme à couper l'ADN et en quelque sorte, elles transforment la topoisomérase I en poison (Chen & Liu, 1994). Les cellules emploient généralement deux stratégies pour développer une résistance aux différentes drogues anti-topoisomérase I. Cette résistance est le résultat soit d'une diminution importante du niveau de topoisomérase I dans la cellule, soit d'une mutation affectant la liaison de la drogue avec l'enzyme sans toutefois affecter l'activité de la topoisomérase de façon importante (Andoh *et al.*, 1987; Sugimoto *et al.*, 1990; Tamura *et al.*, 1990; Kubota *et al.*, 1992; Benedetti *et al.*, 1993; Knab *et al.*, 1993; Tanizawa *et al.*, 1993; Rubin *et al.*, 1994).

1.3.2.2. La résistance à la camptothécine

La camptothécine étant la composé anti-topoisomérase I le plus connu et le plus étudié, les mécanismes de résistance des cellules face à ce dernier sont également les mieux définis. Plusieurs topoisomérases I ont été isolées de lignées cellulaires résistantes à la camptothécine et les mutations responsables de cette résistance ont été caractérisées (Andoh *et al.*, 1987; Sugimoto *et al.*, 1990; Tamura *et al.*, 1990; Kubota *et al.*, 1992; Benedetti *et al.*, 1993; Knab *et al.*, 1993; Tanizawa *et al.*, 1993; Rubin *et*

al., 1994). Des études avec la topoisomérase I humaine reconstituée ont permis de localiser quatre régions dans l'enzyme qui semblent jouer un rôle important dans la résistance à la camptothécine. La première se situe entre les résidus G⁷¹⁷ et N⁷²², soit près du site actif Y⁷²³. La seconde région est à l'interface de l'hélice α 13 (K⁵³²-S⁵³⁴) dans le sous-domaine III du noyau de l'enzyme, et d'un segment formant une boucle entre les feuillets β 6 et β 7 (F³⁶¹-M³⁷⁰) du sous-domaine I de l'enzyme (voir figure 8 de la page 28). La troisième est une thréonine T⁷²⁹ dans la région hydrophobe du domaine carboxy-terminal de l'enzyme et la dernière est un segment du sous-domaine III près de l'hélice α 13 impliquant le résidu G⁵⁰³. Étant donné qu'ils sont situés loin du site actif, les résidus T⁷²⁹ et G⁵⁰³ jouent probablement un rôle plutôt structural dans la résistance à la camptothécine (Redinbo *et al.*, 1998).

1.4 UTILISATION DES POISONS ANTI-TOPOISOMÉRASE I DANS LE TRAITEMENT DES LEISHMANIOSES

Les trypanosomes pathogènes dont *Leishmania* sont des organismes eucaryotes qui se divisent relativement rapidement (4 à 24 heures). Ceci, en association avec le fait que leur ADN mitochondrial est très complexe soutient encore une fois que ces parasite seraient vulnérables aux inhibiteurs de topoisomérase (Liu, 1994b). Une topoisomérase I a été identifiée chez plusieurs trypanosomes (Melendy & Ray, 1987). Une activité topoisomérase I a également été purifiée d'extraits cellulaires de *Trypanosoma cruzi* (Riou *et al.*, 1983) et de *Leishmania donovani* (Chakraborty *et al.*, 1993). Il a été démontré qu'il existe une activité topoisomérase I dans le noyau et

dans le kinétoplaste de ces parasites à l'aide de la camptothécine, un inhibiteur de cette enzyme (Bodley & Shapiro, 1995a).

Tel qu'indiqué dans l'une des sections précédentes, certaines drogues utilisées dans la chimiothérapie des infections parasitaires causées par *Leishmania* ont récemment été démontrées comme ayant une activité anti-topoisomérase I, soit le bromure d'éthidium, le bérénil, la pentamidine, la chloroquine et le Samorin (Shapiro & Englund, 1990). Il existe donc une différence assez importante entre les topoisomérases I du parasite et de l'humain pour pouvoir établir une certaine sélectivité dans le développement de drogues antiparasitaires (Douc-Rasy *et al.*, 1984; Chakraborty & Mujumder, 1988; Bodley *et al.*, 1995b; Obexer *et al.*, 1995). De plus, nous savons que l'activité topoisomérase I est plus importante dans les cellules qui se divisent que dans les cellules qui ne se divisent pas (Liu, 1994a). Ceci explique le succès des poisons anti-topoisomérase I en tant qu'agents antitumoraux (Wall *et al.*, 1966; Wani *et al.*, 1987; Yamashita *et al.*, 1992). Il est donc concevable d'imaginer que l'activité topoisomérase I du parasite serait plus importante que celle du macrophage (sa cellule hôte) assurant ainsi une certaine sélectivité.

Des études avec la camptothécine, le prototype des poisons anti-topoisomérase I, ont permis d'établir une corrélation directe entre le niveau d'activité de la topoisomérase I et l'efficacité de la drogue (la mort cellulaire associée avec l'accumulation de cassures double brin dans le génome) (Drlica & Franco, 1988; Yamashita *et al.*, 1992; Chen & Liu, 1994; Liu, 1994a et 1994b; Wang, 1996).

Puisque le génome du parasite est très dynamique (Vanhamme & Pays, 1995), il est plausible d'imaginer que ce dernier serait vulnérable à l'activité des composés anti-topoisomérase I. L'utilisation de la topoisomérase I comme cible moléculaire dans le traitement des leishmanioses est donc envisageable et la conception de nouveaux composés plus perméables, plus spécifiques et moins toxiques est nécessaire pour répondre à l'émergence de résistances des trypanosomes vis-à-vis les traitements actuels.

2. ARTICLE

Résumé

C'est dans le but de faire une conception plus rationnelle de traitements contre les diverses formes de leishmanioses basée sur l'utilisation de composés anti-topoisomérase I que nous avons dans un premier temps, cherché à cloner le gène de la topoisomérase I de *Leishmania donovani*. Pour ce faire, nous avons amplifié un fragment d'ADN correspondant à une région conservée des topoisomérases IB à l'aide d'oligonucléotides dégénérés et d'ADN génomique du parasite. Ce fragment a par la suite servi au criblage d'une banque génomique. Un cadre de lecture ouvert de 1905 paires de bases codant pour une protéine de 635 acides aminés présentant une homologie de 38,4% et une identité de 54,4% avec la topoisomérase I humaine a été isolé. L'alignement de la séquence de la protéine avec celles d'autres topoisomérases I eucaryotes connues a révélé qu'une grande partie de cette dernière était semblable à ses équivalents chez d'autres organismes. Par contre, l'homologie semble être perdue après ce qui pourrait correspondre à un domaine appelé le noyau de l'enzyme. De plus, aucun site actif tyrosine n'a pu être identifié à l'intérieur d'un motif SKXXY conventionnel. D'ailleurs, suite à l'expression de la protéine chez *Escherichia coli*, nous avons été incapables de détecter quelque activité de relaxation que ce soit dans les conditions *in vitro* testées, et les essais de complémentation d'un mutant *topA* de *E. coli* se sont avérés infructueux. Des hybridations par la technique de Southern ont permis d'écarter la possibilité que nous avons cloné un pseudogène. Des hybridations par la technique de Northern ont révélé que le gène était transcrit en entier et ont permis d'exclure l'hypothèse qu'une forme d'épissage était nécessaire pour l'obtention d'un messager mature. Par ailleurs, nos résultats démontrent que le gène est

transcrit de façon préférentielle dans les parasites en croissance. Les différentes possibilités quant à la contribution du gène à une activité topoisomérase I chez *Leishmania donovani* seront discutées.

J'ai réalisé tout le travail présenté dans cet article sauf pour les deux hybridations par la méthode de Northern et la construction de la banque génomique. L'article a été soumis au journal « Nucleic Acids Research ».

**Characterization and expression of a gene from *Leishmania donovani* coding
for a protein that closely resembles a type IB topoisomerase.**

Sonia Broccoli¹, Jean-François Marquis², Barbara Papadopoulou², Martin Olivier²
and Marc Drolet^{1*}

¹Département de Microbiologie et immunologie, Université de Montréal, C.P.
6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7 and ²Centre
de recherche en infectiologie du CHUL, Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4G2.

*Corresponding author

Phone: 514-343-5796

FAX: 514-343-5701

Electronic mail address: Marc.Drolet@umontreal.ca

2.1. ABSTRACT

In order to clone the gene encoding a type I DNA topoisomerase from *Leishmania donovani*, a PCR-amplified DNA fragment obtained with degenerate oligonucleotides was used to screen a genomic library from this parasite. An open reading frame of 1905 bases encoding a putative protein of 635 amino acid residues was isolated. A substantial part of the protein shares a significant degree of homology with the sequence of other known members of the IB topoisomerase family, in a highly conserved region of these enzymes termed the core domain. However, homology is completely lost after this conserved central core. Moreover, no conventional active tyrosine site could be identified. In fact, the protein expressed in *Escherichia coli* did not show any relaxation activity *in vitro* and was unable to complement a mutant deficient in topoisomerase I activity. The result of Southern blot experiments also ruled out the possibility that the cloned gene was a pseudogene. Northern analysis revealed that the gene was transcribed in its full length and also excluded the possibility that some form of splicing is necessary to produce a mature messenger. Furthermore, our results indicate that the gene is preferentially transcribed in actively growing *Leishmania donovani* promastigotes and that it is also expressed in other kinetoplastid parasites.

2.2. INTRODUCTION

DNA topoisomerases participate in nearly all cellular activities involving DNA (reviewed in Wang, 1996). Various cellular processes such as replication, transcription, and the movement of helicases along the DNA template generate supercoils that are subsequently removed by topoisomerases. Furthermore, these enzymes could also be involved in recombination and are known to play an important role in chromosome segregation, condensation and decondensation. DNA topoisomerases alter the topology of DNA via a reaction pathway that entails (i) noncovalent binding of the enzyme to duplex DNA, (ii) cleavage of the DNA template with concomitant formation of a covalent DNA-protein intermediate, (iii) strand passage and (iv) religation of the broken strand(s) (Wang, 1996). The DNA template is nicked by the topoisomerase following a transesterification reaction during which the enzyme forms a covalent phosphotyrosyl bond with the DNA via the tyrosine active site (Liu, 1994; Wang, 1996). Topoisomerases can essentially be divided into two classes: type I and type II DNA topoisomerases. Type I topoisomerases are monomeric proteins that nick one strand of the DNA duplex and relax the double helix by rotating the noncovalently held segment about the phosphodiester bond in the unbroken strand opposite the protein-induced nick (Liu, 1994; Wang, 1996). These enzymes can be further divided into type IA (bacterial) and IB (eukaryotic) topoisomerases. Type II topoisomerases are homodimeric enzymes that alter DNA topology by producing a transient nick in

both strands of the double helix, forming a gate through which both strands of the DNA duplex can pass (Wang, 1996).

Topoisomerases have been shown to be the molecular targets of several molecules of natural and/or synthetic sources (reviewed in Drlica & Franco, 1988 and Chen & Liu, 1994). Some of these drugs specifically interact with type I topoisomerases, others recognize type II topoisomerases. Camptothecin, an extensively studied type I topoisomerase poison, interferes with the breakage-reunion reaction of topoisomerase I, by trapping the key covalent intermediate, the cleavable-complex (Hsiang *et al.*, 1985). Cell death is believed to occur when the replication machinery collides with an open cleavable-complex (Covey *et al.*, 1989; Hsiang *et al.*, 1989; D'Arpa *et al.*, 1990).

The parasite of the genus *Leishmania*, a member of the trypanosomatidae family, is an intracellular protozoan that infects the macrophages of mammals including humans. Various pathologies can develop following infection by *Leishmania* depending on the species involved, encompassing cutaneous, mucocutaneous and the deadly visceral leishmaniasis. The incidence of all three types of leishmaniasis is currently on the rise mainly because of the growing number of travelers in endemic areas of the world, the lack of effective vaccines, the difficulty of vector control and the parasite's increasing resistance to chemotherapy (Ouellette & Papadopoulou, 1993). Some classical anti-trypanosomal drugs were recently identified as topoisomerase poisons (Shapiro & Englund, 1990). These compounds do not induce DNA fragmentation in

mammalian cells, but they stabilize cleavable-complexes in kinetoplast DNA of trypanosomes (Shapiro & Englund, 1990; Burri *et al.*, 1996). Other studies in trypanosomes have shown a direct correlation between cleavable-complex accumulation (leading to double-strand breaks) and cytotoxicity of several type I and II topoisomerase inhibitors, including camptothecin (Werbovetz *et al.*, 1992 and 1994; Bodley *et al.*, 1995a and 1995b; Burri *et al.*, 1996). Taken together, the results of these studies strongly suggest that a different drug selectivity can be established between the human and trypanosomal topoisomerases. Topoisomerase I activity has been detected in several parasites of the trypanosomatidae family (Burri *et al.*, 1996). As a first step in the development of chemotherapy against *L. donovani* infections based upon the use of DNA topoisomerase I as a molecular target, we have used degenerate oligonucleotides to isolate a type I topoisomerase gene from this parasite. We have cloned a topoisomerase I-like gene from *L. donovani* coding for a protein of 635 amino acids and presenting an extensive degree of homology with the central core. Surprisingly, the C-terminal region of the protein does not seem to present any resemblance to the highly conserved C-terminal domain of type IB topoisomerases which normally contains the tyrosine active-site within a conserved SKXXY motif (Eng *et al.*, 1989; Lynn *et al.*, 1989; Shuman *et al.*, 1989). To our knowledge, this is the first report of a topoisomerase I-like gene from this parasite.

2.3. MATERIALS AND METHODS

Cloning of the *Leishmania donovani* TOP1-like gene

The sequences for synthetic DNA primers were previously generated by reverse translation of peptide sequences in a region of extensive homology among eukaryotic type I topoisomerases (Hsieh *et al.*, 1992). The sequences for the 5' and 3' oligonucleotides, each consisting of 256 and 384 permutations respectively, to reflect all possible codon degeneracies are: 5'-GGGGGAATTCTT(T/C)(C/A)G(T/C/G/A)AC(A/G/CIT)TA(T/C)AA(T/C)GC-3' for the 5' primer (amino acid residues F⁵⁸⁹ to A⁵⁹⁴ of human TopoI), and 5'-AAAAAAGCTT(C/T)TG(A/G)TG(A/G)TT(A/G)CA(A/G/C/T)A(A/G)(A/G/T)AT-3' for the 3' primer (residues Q⁶³³ to I⁶²⁸ of human TopoI). Two micrograms of genomic DNA from *Leishmania donovani* were used for the PCR, which was carried out at 25°C for 2 minutes, followed by a 1 minute extension at 72°C, for 60 cycles. The PCR products were routinely analyzed by electrophoresis on a 5% polyacrylamide gel. A 138 bp fragment was obtained and subcloned into pBluescript SK (Stratagene) using the *EcoRI-HindIII* sites that had been introduced into the 5' and 3' primers. A random-labeled probe (Random Primed DNA Labeling Kit from Boehringer Mannheim) was prepared from this 138 bp PCR fragment, and used to screen a genomic library of *L. donovani infantum* (strain LEM1317). The library was obtained as described (Lamontagne & Papadopoulou, 1999). Essentially, partially digested *Sau3A* genomic DNA fragments were cloned into the *BamHI* site of the cLHyg cosmid shuttle vector. Four cosmids probed positive: B₇₆₅, C₂₇₈, C₁₀₂₉ and D₂₆₇. Since a Southern blot experiment revealed that cosmid C₁₀₂₉ shared more common DNA

fragments with *L. donovani* genomic DNA than any of the other three cosmids, it was chosen for subcloning the *TOPI*-like gene.

Hybridization studies

DNA from *L. donovani* Sudanese strain 1S (a generous gift from Dr. Albert Descôteaux, Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada) was extracted as described (Medina-Acosta & Cross, 1993). DNA fragments generated by various restriction enzymes were resolved on a 0.8% agarose gel and transferred to a Nytran Plus (Mandel) nylon membrane as described (Sambrook *et al.*, 1989). DNA probes were generated by random-labeling. To verify for the presence of pseudogenes, DNA fragments of the cloned *TOPI*-like gene were used as probes. Total RNA from *Leishmania* cells was extracted using TRIzol (Gibco BRL). RNA was resolved on a 1% agarose gel, transferred to a Nytran Plus nylon membrane, and probed with *SacI* DNA fragments from the cloned *TOPI*-like gene. Hybridization, in the absence of formamide, and washings were performed as described (Sambrook *et al.*, 1989). Hybridization signals were revealed by autoradiography using Fuji medical X-ray films. Membranes were reused by stripping in 0.1N NaOH (15 minutes) followed by two washings in 0.5 M Tris, 0.1% SDS for a period of 15 minutes at room temperature.

Sequencing of the *TOPI*-like gene from *L. donovani*

A 3,5 kb *SalI* fragment from cosmid C₁₀₂₉ that probed positive with the 138 bp PCR fragment and containing over half of the gene, was subcloned into M13mp19 phage vector. A 2,1 kb *PstI* fragment from cosmid C₁₀₂₉, with an

overlapping region of 168 bp with the 3,5 kb *SalI* fragment (see Fig. 10 on page 63 for a restriction map), was also subcloned into M13mp19 phage vector. This *PstI* fragment also probed positive with the PCR fragment and contains the remaining part of the gene. The complete sequence of *L. donovani* *TOP1*-like gene was determined by using an ALF automatic sequencer (Amersham Pharmacia Biotech) and a series of synthetic oligonucleotides as primers. The nucleotide sequence data was assembled and processed with the Oxford Molecular Group MacVector program, version 6.0. The multiple sequence alignment was established with the Clustal algorithm of MacVector.

Parasite cell culture and growth induction

Promastigotes from *L. donovani* parasites were grown in supplemented SDM-79 medium at room temperature as described (Olivier & Tanner, 1987; White *et al.*, 1988). *Leishmania* parasites were obtained from Dr. Albert Descôteaux (Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada). For the growth induction experiments, 10 ml of a *Leishmania donovani* promastigote culture at stationary metacyclic phase (day 7) were transferred to a total of 50 ml of fresh SDM-79 medium for given periods of time.

2.4. RESULTS AND DISCUSSION

Cloning of the *TOP1*- like gene from *Leishmania donovani*

Degenerate oligonucleotides were constructed and used to generate a PCR fragment from *Leishmania donovani* genomic DNA as described under Materials and Methods. A 138 bp fragment was obtained and its nucleotide sequence was determined. Over 80% of the nucleotides in third position of the codons were found to be guanine or cytosine residues (data not shown), which is a hallmark of *Leishmania* genes (Langford *et al.*, 1992). An alignment of the predicted amino acid sequence with the corresponding region of known eukaryotic type I topoisomerases demonstrated that 35 of the 46 amino acids in that segment were conserved (data not shown). This suggested that we had indeed amplified the targeted region of the *L. donovani* topoisomerase I gene. A random-labeled probe was prepared from the above 138 bp PCR fragment and used to screen a *L. donovani infantum* genomic library. Three of the four cosmids that probed positive with the fragment as well as genomic DNA from *L. donovani* were analyzed by Southern blot. What the Southern blot essentially reveals is that common fragments probed positive from both *L. donovani* genomic DNA and the tested cosmids (data not shown). The cosmid with a larger number of common fragments (C₁₀₂₉) was selected for this study. The fragments that were common to both genomic and cosmid DNA were considered for subcloning.

Sequence analysis of the TopoI-like protein

Two fragments containing altogether the entire *TOPI*-like gene with an overlapping region of 168 bp were sequenced: a 3.5 kb *SalI* fragment containing roughly the first half of the gene and a 2.1 kb *PstI* fragment containing the remaining part of the gene (see Fig. 10 on page 63 for a restriction map). Taking *Leishmania donovani* codon usage into consideration, sequence data was assembled and processed. A single open reading frame (ORF) consisting of 1905 nucleotides was found. The predicted amino acid sequence (635 residues) is presented in Figure 11 on page 65 as well as its alignment with type I topoisomerases from several sources. It was found that the *L. donovani* cloned ORF and the human topoisomerase I share 38.4% identity and 54.4% similarity rates. Roughly, the first 472 amino acid residues of the ORF present an extensive degree of homology with known eukaryotic type I topoisomerases. Eukaryotic topoisomerases are monomeric in nature and can essentially be divided into four major domains (Fig. 11 on page 65), two of which, the core and the C-terminal domains, are required for its catalytic activity (Stewart *et al.*, 1996 and 1997; Champoux, 1998). In the human counterpart, roughly the first 197 amino acid residues represent the N-terminal domain that is likely important for targeting the enzyme to the nucleus of the cell. This domain is poorly conserved and its length varies among representatives. For this reason, its sequence from the other known type I topoisomerases was not included in the alignment. The core domain in the human TopoI encompasses approximately residues K¹⁹⁸ to I⁶⁵¹, is highly conserved and is important for preferential binding of the enzyme to supercoiled DNA. The C-terminal domain extends roughly from residues Q⁶⁹⁷ to F⁷⁶⁵ and contains the

catalytically important active site tyrosine (Y⁷²³). The core and the C-terminal domains are connected by a poorly conserved linker region (approximately residues D⁶⁵² to E⁶⁹⁶) (Stewart *et al.*, 1996; Champoux, 1998). The ORF region of the *TOP1*-like gene from *L. donovani* that resembles a eukaryotic type I topoisomerase corresponds to the central core domain (Fig. 11 on page 65). Interestingly, the N-terminal region of the *L. donovani* protein is relatively short. In fact, there are only 10 amino acid residues before the homology with the central core domain of topoisomerases I begins.

Alanine-substitution mutation studies with vaccinia topoisomerase I showed that His²⁶⁵ is essential for the enzyme catalytic activity (Petersen & Shuman, 1997). Interestingly, this His residue is conserved among all known members of the IB topoisomerase family in a VAILCNH motif, and is also present in the predicted amino acid sequence of the *L. donovani TOP1*-like gene (H⁴⁵³, see Fig. 11 on page 65). His²⁶⁵ is only 9 amino acids away from the tyrosine active site in the vaccinia enzyme and the interval between the homologous histidine of cellular topoisomerases and their respective tyrosine active site is interrupted by a linker region of variable length. The linker region has no counterpart in the poxvirus topoisomerases and is poorly conserved within the cellular IB topoisomerase family. It is also dispensable for catalytic activity (Stewart *et al.*, 1996 and 1997; Champoux, 1998). The tyrosine active site of these enzyme usually lies within a SKXXY motif within the C-terminal end of the topoisomerase I (Eng, *et al.*, 1989; Lynn *et al.*, 1989; Shuman *et al.*, 1989). Amino acid sequence analysis of the *L. donovani* open reading frame after the first 472 amino acid

residues seems to indicate a loss of homology starting approximately in the region where the linker domain would be expected to begin if such a domain were to exist. Moreover, no SKXXY motif could be identified. However, following a region of substantial disparity among the sequences of the aligned topoisomerases, we found a stretch near the end of the ORF (in the conserved DVPIEK motif region) in which homology seems to be recovered in (amino acid residues D⁵⁹⁷ to K⁶⁰⁹ of the protein, see Fig. 11 on page 65). At this point, we propose three explanations for the observed phenomenon: 1) one or several mutations had occurred within the cosmid, leading to the loss or replacement of the tyrosine active site, 2) this was a new class of eukaryotic type I topoisomerases with an active site other than the conventional tyrosine, or 3) we had cloned a pseudogene.

Sequencing of the 3' region of the gene from genomic DNA

It is a known fact that the overproduction of active topoisomerases in bacteria is problematic, if not lethal, for the cells (Taylor & Menzel, 1995). It is therefore possible that inactivated versions of the topoisomerase I gene are the only ones that could be maintained in the cell. In that case, only clones encoding a mutated inactive form of the topoisomerase I could be recovered. To verify this hypothesis, we conducted a PCR reaction with genomic DNA from *Leishmania donovani* using one 5' oligonucleotide corresponding to position F⁴⁰⁹ to S⁴¹⁵ of the ORF (before the loss of homology), and with the other in the 3' end of the gene (236 nucleotides following the stop codon). The PCR product was subcloned and sequenced. The nucleotide sequence obtained was identical to the one stemming from the cosmid DNA, excluding the possibility of mutations (data not shown).

Protein expression and relaxation assays

Catalytic residues other than the tyrosine active site have never been identified in topoisomerases although histidine and cysteine residues were suggested (Wang, 1996). Because they share common structural and mechanistic features, type IB DNA topoisomerases and site-specific recombinases are more often than not, believed to derive from a common ancestral strand transferase (Cheng *et al.*, 1998). DNA strand-breakage and joining by site-specific recombinases occur by transesterification reactions. The integrase family of the conservative site-specific recombinases perform these reactions via a tyrosine residue as such is the case with topoisomerases, while the resolvase-invertase family performs the same reactions by a serine active site (Sadowski, 1993). Interestingly, a serine (S⁵⁸⁰) of the *L. donovani* ORF is aligned with the tyrosine active sites of other known members of the topoisomerase IB family (see Fig. 11 on page 65). With this in mind, the *TOPI*-like gene was cloned into a pET-21a expression vector with its own start ATG codon and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells under the control of phage T7 RNA polymerase. Growth and induction were conducted, cells were lysed and the TopoI-like protein was purified by chromatography on a hydroxyapatite column. The proteins were eluted with a linear gradient of 0.2 M to 0.9 M potassium phosphate and the protein of interest eluted in fractions between 0.55 M and 0.65 M KPi inclusively, with a peak at 0.6 M KPi (data not shown). This is consistent with the elution pattern of the *Caenorhabditis elegans* topoisomerase I, also a member of the type IB topoisomerases (Park & Koo, 1994). The molecular weight of the protein, as

determined by SDS-PAGE, matches very well with the estimated 73.6 kDa predicted by its amino acid composition (data not shown). Relaxation assays with dialyzed fractions in several assay conditions proved unsuccessful. It has previously been demonstrated that a eukaryotic type I topoisomerase can complement an *E. coli topA* mutant when cloned in an expression vector under the control of an inducible promoter, even in the absence of the inducer (Taylor & Menzel, 1995 and Bjornsti & Wang, 1987). Since the *L. donovani* TopoI-like recombinant protein was catalytically inactive in our *in vitro* experiments, we next sought to express it *in vivo* and to test for its ability to complement an *E. coli topA* null mutant (Drolet *et al.*, 1995). Consistent with our *in vitro* experiments, no complementation could be detected (data not shown), thus challenging the hypothesis that the protein was a member of a new family of topoisomerases I, one that relaxes DNA via an active site other than the conventional tyrosine.

Screening for other *TOPI*-like genes

In order to verify the possible existence of additional *TOPI*-alleles, genomic DNA from *L. donovani* was analyzed by Southern blot. DNA was digested with a total of 15 restriction enzymes. The results of the described Southern blots are presented in figures 12 and 13 on pages 67 and 69 respectively. Genomic DNA from the parasite was digested with several enzymes whose restriction sites were absent in the *TOPI*-like gene: *Bam*HI, *Apa*LI, *Kpn*I, *Cla*I, *Eco*RI and *Nde*I (Figs. 12 and 13 on pages 65 and 67 respectively, and see Fig. 10 on page 63 for a restriction map). The membranes were first probed with a 1069 bp *Sac*I fragment spanning the first part of the gene (Fig. 12A and 13A on pages 65

and 67 respectively), the one that substantially resembles a *TOPI* gene. In all cases, a single band probed positive with this fragment. Restriction enzymes with known sites in the gene were also used in the blots: *SalI*, *SacI*, *PstI*, *PvuII*, *SacII*, *AvaI*, *NruI*, *BglI* and *XmnI* (Figs. 12 and 13 on pages 65 and 67 respectively, and see Fig. 10 on page 63 for a restriction map). Again, the bands that probed positive with the 1069 bp *SacI* fragment are consistent with what was predicted by the restriction map and no other bands appeared on the blot. Together, these results suggest that there are no additional *TOPI* alleles in the genome of *L. donovani*.

The membranes were subsequently stripped as described and probed with a random-labeled, 750 bp-long *SacI* fragment (Figs. 12B and 13B on pages 65 and 67 respectively) corresponding to the end of the gene plus an extra 285 bp of DNA following the stop codon (see Fig. 10 on page 63). In the case of enzymes that do not cut in the *TOPI*-like gene, the bands that had probed positive with the 5' *SacI* fragment also probe positive with the 3' fragment. All our results therefore indicate that the cloned gene really exists and that it is present as a single copy in the genome of the parasite.

Expression of the *TOPI*-like gene

A Northern blot experiment was conducted to establish how the *TOPI*-like gene is expressed in the parasite. Total RNA was extracted from growing *L. donovani* promastigotes at different time intervals, as described under Materials and Methods. The RNA was subsequently probed with the 1069 bp *SacI* fragment overlapping the region of the gene coding for a protein that resembles a type I

topoisomerase. In each case, a single band of approximately 3.4 kb probed positive with the fragment. As can be seen in Figure 14 on page 71, the intensity of the band increases as the parasite enters the growing phase and dramatically decreases when the stationary phase is reached. This suggests that the *TOP1*-like gene is preferentially transcribed in actively growing *Leishmania donovani*. Additionally, the fact that a single band probed positive with the *TOP1*-like fragment seems to suggest that no other forms of the messenger exist in the cell. Trypanosomes have a distinctive way of storing and expressing their genetic information. No introns have been identified in the genes of *Leishmania* so alternative splicing has not to date, been described in these and related parasites (reviewed in Vanhamme & Pays, 1995). To further examine the question of whether the *TOP1*-like gene was fully transcribed, the membrane was stripped and reprobed with the *SacI* fragment in the 3' region of the gene. Again, a band of 3.4 kb probed positive with the fragment suggesting that the gene is transcribed in its full length, and confirming our belief that no form of alternative splicing occurs to yield a mature *TOP1* messenger. Messengers of similar sizes were also detected in other kinetoplastid parasites when the 1069 bp *SacI* fragment from the *TOP1*-like gene of *Leishmania donovani* was used as a probe (Fig. 15 on page 73).

In light of our results, we sought to explain how this gene could participate in conferring a topoisomerase I-like activity in *Leishmania donovani*. Three possibilities are considered. First, it is conceivable that the gene does encode a fully active topoisomerase I but that no activity was detected in our *in vitro* and/or *in vivo* conditions. Despite the fact that a type IB topoisomerase with an active site

other than the conventional tyrosine has never been described, the possibility cannot be ruled out, and it would account for the fact that the protein was inactive in the assay conditions that were used with other known eukaryotic type IB topoisomerases. Since not much is known on a molecular level in *Leishmania donovani* and other related parasites, another possibility is that some unknown and yet undescribed form of posttranscriptional or posttranslational modification(s) occur(s) in these parasites to yield a fully active topoisomerase I. The third hypothesis, which seems to be the most attractive, is that the active site of the *L. donovani* topoisomerase I would be carried by a second subunit and therefore encoded on a different gene. It is now well established that human topoisomerase I activity can be reconstituted *in vitro* by mixing purified core domain together with C-terminal fragments of variable lengths (Stewart *et al.*, 1997). Recently, a two-hybrid system was used to identify proteins that interact with the central conserved domain of *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase I (Park & Koo, 1998). Several different C-terminal domain-containing fragments of topoisomerase I were identified as specific interacting polypeptides. None of these fragments overlapped with the core domain. Moreover, coexpression of the two domains in yeast partially complemented the growth problems of a mutant deficient in topoisomerase I activity and *in vitro* assays confirmed this restored activity (Park & Koo, 1998). For the moment, we can only speculate on what the situation is really like in the parasite, but the last hypothesis is a conceivable one, and works are currently in progress to test it.

Figure 10. Restriction map of the *TOP1*-like gene from *Leishmania donovani*. The white area of the restriction map corresponds to the *TOP1*-like ORF, whereas the black area corresponds to the 285 bp that follow this ORF (the *SacI* site being from the vector). PCR probe is the 138 bp DNA fragment initially amplified from *L. donovani* genomic DNA that was used for genomic bank screening. 5' and 3' probes respectively correspond to the 5' (1069 bp) and 3' (750 bp) *SacI* fragments that were used in the Southern blot experiments.

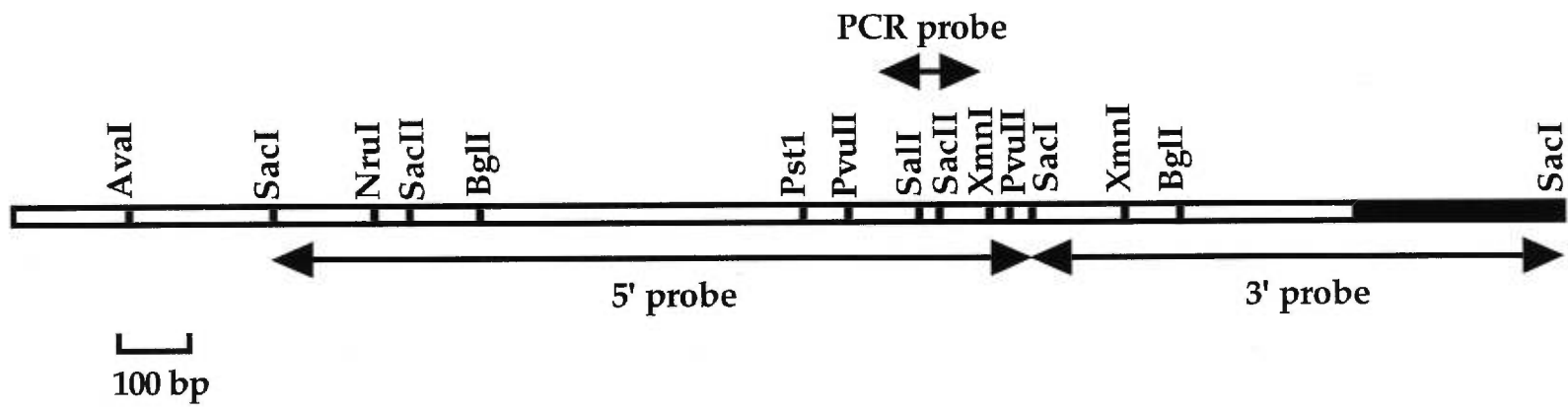
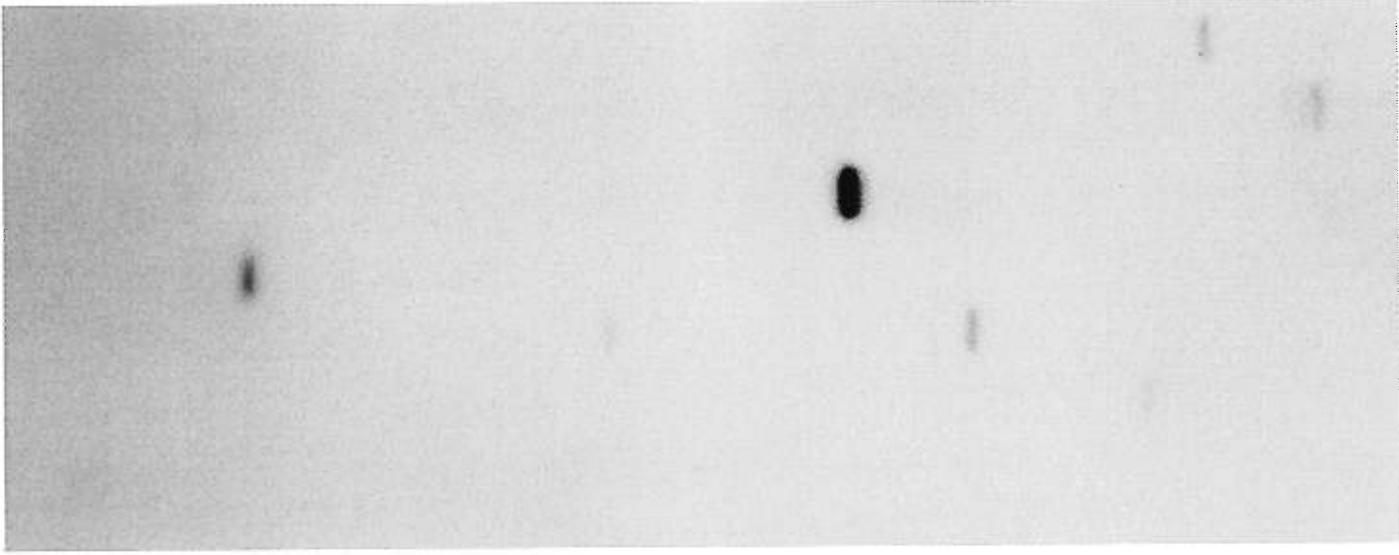


Figure 11: Sequence alignment of the TopoI-like protein from *Leishmania donovani* (LD) with known TopoI from *Homo sapiens* (HS), *Saccharomyces cerevisiae* (SC), and *Drosophila melanogaster* (DM). Amino acid residues in light and dark gray boxes respectively represent conserved substitutions and identical residues. Sequences between the first two arrows include the human TopoI core domain, whereas sequences delimited by the second and third arrows correspond to the human TopoI linker domain. Sequences that follow the last arrow correspond to the human TopoI C-terminal domain that normally includes the active site tyrosine residue (pointed by an arrowhead) which is absent in the LD sequence.

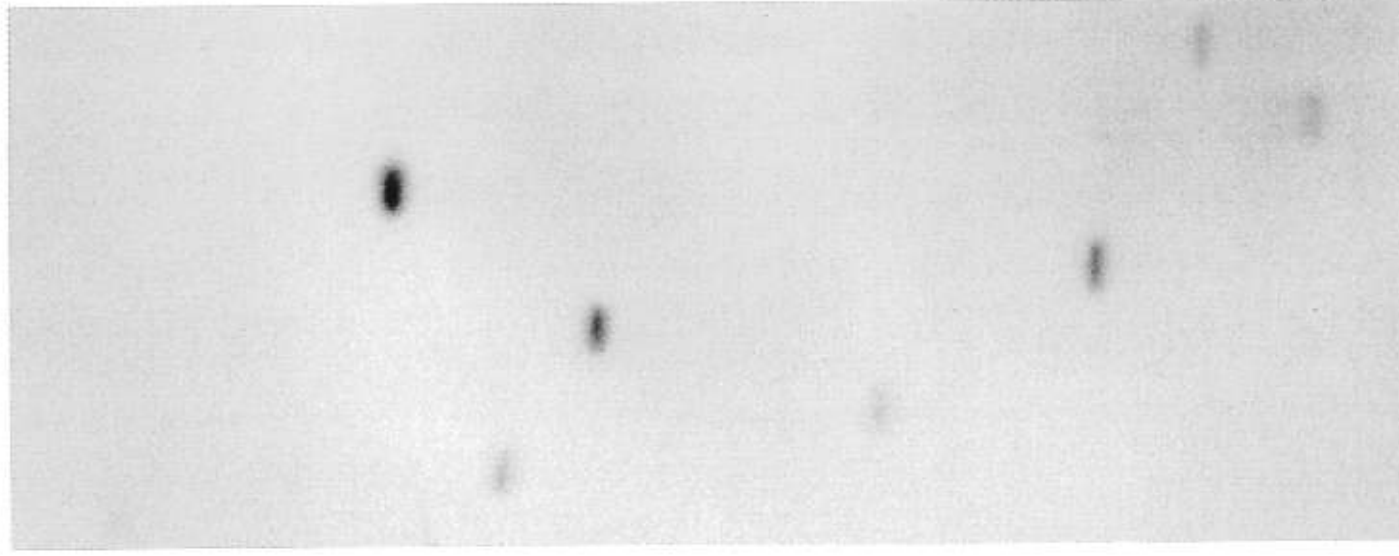
Figure 12: The first set of Southern blots to screen for the presence of *TOP1*-like pseudogenes in *Leishmania donovani*. Southern blot experiments were performed as described under Materials and Methods. The membrane was probed with the 1069 bp 5' *SacI* DNA fragment (A), stripped and then reprobed with the 750 bp 3' *SacI* DNA fragment (B).

A



BamH I
EcoR I
Sal I
Sac I
Pst I
Pvu II
Sac II

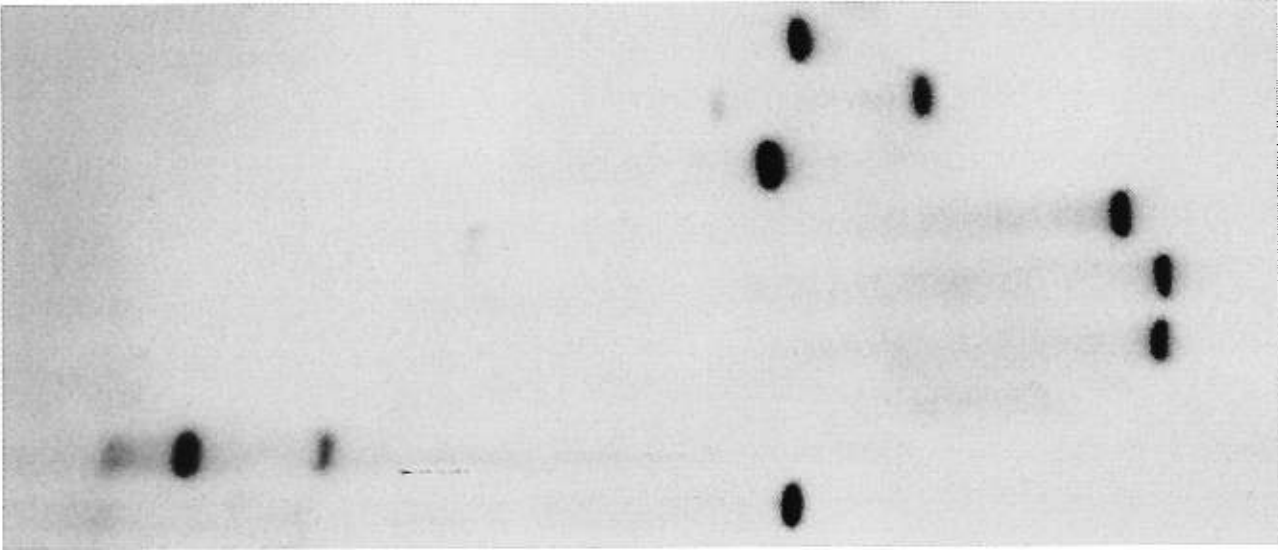
B



BamH I
EcoR I
Sal I
Sac I
Pst I
Pvu II
Sac II

Figure 13: The second set of Southern blots to screen for the presence of *TOP1*-like pseudogenes in *Leishmania donovani*. Southern blot experiments were performed as described under Materials and Methods. The membrane was probed with the 1069 bp 5' *SacI* DNA fragment (A), stripped and then reprobated with the 750 bp 3' *SacI* DNA fragment (B).

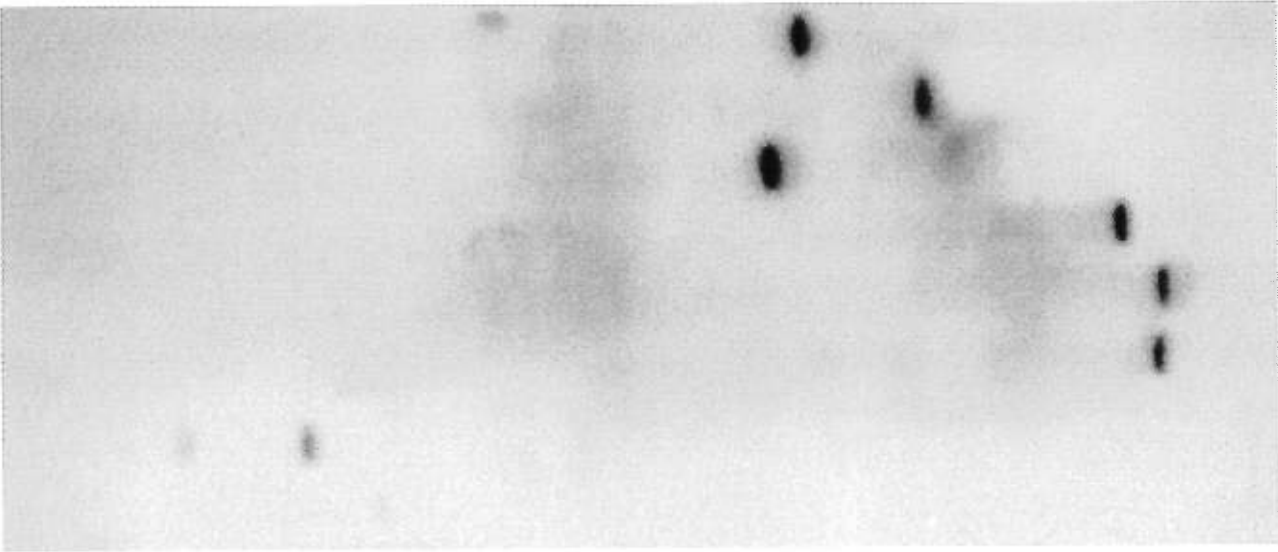
A



Ava I
Nru I
ApaL I
Cla I
Kpn I
Nde I

Bgl I
Xmn I

B



Ava I
Nru I
ApaL I
Cla I
Kpn I
Nde I

Bgl I
Xmn I

Figure 14: Expression of the *TOP1*-like gene in *Leishmania donovani* in relation to its growth. Parasite culture and Northern blot were performed as described under Materials and Methods. The *TOP1*-like messenger (*topo-1*) is 3.4 kb long according to molecular weight markers.

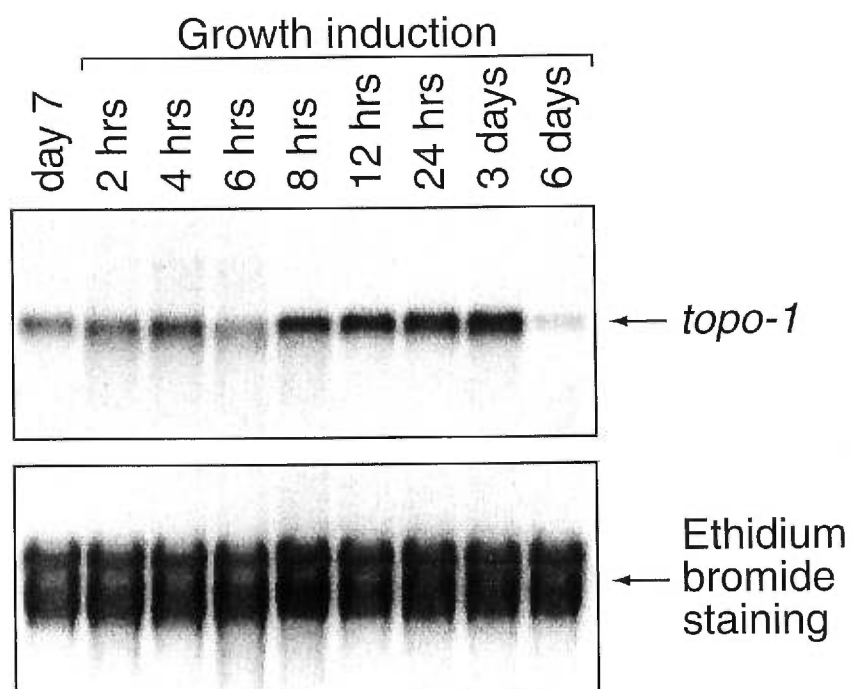
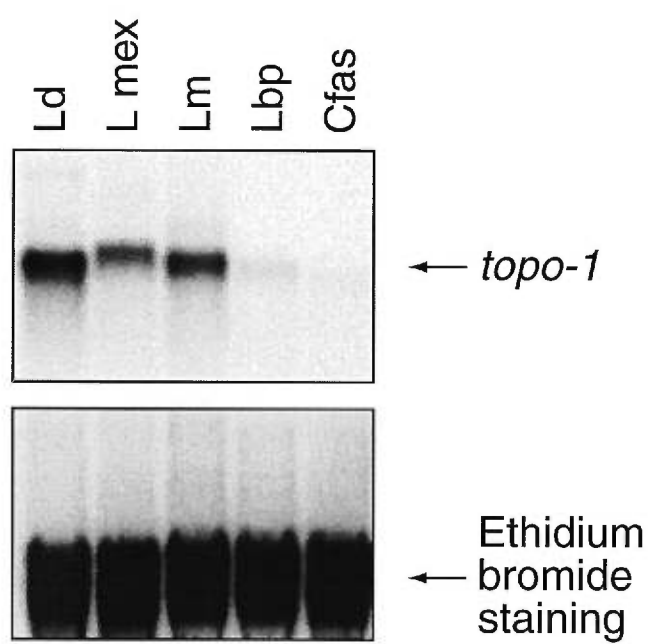


Figure 15: Detection of *TOP1*-like messengers in various kinetoplastid parasites. Northern blots were performed as described under Materials and Methods. RNA from various kinetoplastid parasites including *Leishmania donovani* (Ld), *Leishmania mexicana* (Lmex), *Leishmania major* (Lm), *Leishmania braziliensis* (Lbp) and *Crithidia fasciculata* (Cfas) was used for Northern blot analysis with the 1069 bp 5' *SacI* DNA fragment from the *TOP1*-like gene of *Leishmania donovani*.



2.5. ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Albert Descôteaux (Institut Armand-Frappier) for *L. donovani* strains, and invaluable help in many aspects of this work. This work was supported by grants from the FCAR (Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide ... la Recherche) to M.D. M.D. and M.O. are recipient of a scholarship from les Fonds de la recherche en santé du Québec and B.P. is a recipient of a scholarship from the Medical Research Council of Canada.

2.6. REFERENCES

Bjornsti, M.A., and Wang, J.C. (1987) Expression of yeast DNA topoisomerase I can complement a conditional-lethal DNA topoisomerase I mutation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 8971-8975.

Bodley, A.L., and Shapiro, T.A. (1995a) Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on trypanosomes and *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 3726-3730.

Bodley, A.L., Wani, M.C., Wall, M.E., and Shapiro, T.A. (1995b) Antitrypanosomal activity of camptothecin analogs: structure-activity correlations. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 937-942.

Burri, C., Bodley, A.L., and Shapiro, T.A. (1996) Topoisomerases in kinetoplastids. *Parasitol. Today.* **12**, 226-231.

Champoux, J.J. (1998) Domains of human topoisomerase I and associated functions. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **60**, 111-132.

Chen, A.Y. and Liu, L.F. (1994) DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**, 191-218.

Cheng, C., Kussie, P., Pavletic, N., and Shuman, S. (1998) Conservation of structure and mechanism between eukaryotic topoisomerase I and site-specific recombinases. *Cell*. **92**, 841-850.

Covey, J.M., Jaxel, C., Kohn, K.W. and Pommier, Y. (1989) Protein-linked DNA strand breaks induced in mammalian cells by camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I. *Cancer. Res.* **49**, 5016-5022.

D'Arpa, P., Beardmore, C., and Liu, L.F. (1990) Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase I poisons. *Cancer. Res.* **50**, 6919-6924.

Drlica, K., and Franco, R.J. (1988) Inhibitors of DNA topoisomerases. *Biochemistry* **27**, 2253-2259.

Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, É., Liu, L.F., and Crouch, R.J. (1995) Overexpression of RNaseH partially complements the growth defect of an *Escherichia coli topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 3526-3530.

Eng, W., Pandit, S.D., and Sternglanz R. (1989) Mapping of the active site tyrosine of eukaryotic DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **262**, 13373-13376.

Hsiang Y.-H., Hertzberg, R., Hecht, S., and Liu, L.F. (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **260**, 14873-14787.

Hsiang, Y-H., Lihou, M.G., and Liu, L.F (1989) Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable-complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res.* **49**, 5077-5082.

Hsieh, T.-S., Brown, S.D., Huang, P., and Fostel J. (1992) Isolation and characterization of a gene encoding DNA topoisomerase I in *Drosophila melanogaster*. *Nucl. Ac. Res.* **23**, 6177-6182.

Lamontagne, J., and Papadopoulou, B. (1999) Developmental regulation of the spliced leader RNA region in *Leishmania donovani* amastigotes is mediated by specific polyadenylation. *J. Biol. Chem.*, in press.

Langford, C.K., Ullman, B., and Landfear, S.M. (1992) *Leishmania*: codon utilization of nuclear genes. *Exp. Parasitol.* **74**, 360-361.

Liu, L.F. (1994) *DNA topoisomerases: biochemistry and molecular biology; Advances in Pharmacology*, Vol. 29A; Boca Raton, Academic Press, USA, 320pp.

Lynn, R.M., Bjornsti, M., Caron, P.R., and Wang, J.C. (1989) Peptide sequencing and site-directed mutagenesis identify tyrosine-727 as the active site tyrosine of *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 3559-3563.

Medina-Acosta, E., and Cross, G.A.M (1993) Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple "mini-prep" procedure. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**, 327-330.

Olivier, M., and Tanner, C.E. (1987) Susceptibilities of macrophage populations to infection in vitro by *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.* **55**, 467-471.

Ouellette, M., and Papadopoulou, B. (1993) Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. *Parasitol. Today.* **9**, 150-153.

Park, S.M., and Koo H.-S. (1994) Purification of *Caenorhabditis elegans* DNA topoisomerase I. *Biochem. et Biophys. Acta.* **1219**, 47-54.

Park, H., and Sterglanz, R. (1998) Two separate conserved domains of eukaryotic DNA topoisomerase I bind to each other and reconstitute enzymatic activity. *Chromosoma.* **107**, 211-215.

Petersen, B.F., and Shuman, S. (1997) Histidine 265 is important for covalent catalysis by vaccinia topoisomerase and is conserved in all eukaryotic type I enzymes. *J. Biol. Chem.* **7**, 3891-3896.

Sadowski, P.D. (1993) Site-specific genetic recombination: hops, flips, and flops. *FASEB J.* **7**, 760-767.

Sambrook, J., Fritsch E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning-a laboratory manual* (Second edition); Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York.

Shapiro, T.A., and Englund, P.T. (1990) Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 950-954.

Shuman, S., Kane, E.M., and Morham, S.G. (1989) Mapping the active site tyrosine of vaccinia virus DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 9793-9797.

Stewart, L., Ireton, G.C., and Champoux, J. (1996) The domain organization of human topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **13**, 7602-7608.

Stewart, L., Ireton, G.C., and Champoux, J.J. (1997) Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation. *J. Mol. Biol.* **269**, 355-372.

Taylor, S.T., and Menzel R. (1995) The creation of a camptothecin-sensitive *Escherichia coli* based on the expression of the human topoisomerase I. *Gene*. **167**, 69-74.

Vanhamme, L., and Pays, E. (1995) Control of gene expression in trypanosomes. *Microb. Rev.* **2**, 223-240.

Wang, J.C. (1996) DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 635-692.

Werbovetz, K.A., Lenhert, E.K., Macdonald, T.L., and Pearson, R.D. (1992) Cytotoxicity of acridine compounds for *Leishmania* promastigotes in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 495-497.

Werbovetz, K.A. Spoor, P.G., Pearson, R.D., and Macdonald, T.L. (1994) Cleavable complex formation in *Leishmania chagasi* treated with anilinoacridines. *Mol. Biochem. Parasitol.* **65**, 1-10.

White, T.C., Fase-Fowler, F., Van Luenen, H., Calafat, J., and Borst, P. (1988) The H circles of *Leishmania tarentolae* are a unique amplifiable system of oligomeric DNAs associated with drug resistance. *J. Biol. Chem.* **263**, 16977-16983.

3. DISCUSSION

Le but ultime de cette étude étant la conception de nouvelles chimiothérapies contre les différentes infections causées par *Leishmania*, basée sur l'utilisation de composés ayant pour cible la topoisomérase I du parasite, nous voulions mettre au point un système *in vitro* permettant le criblage de ces différentes substances. Afin d'obtenir des quantités suffisantes d'enzyme pour nos études, nous avons choisi d'isoler le gène codant pour la topoisomérase I de *L. donovani*. C'est avec un fragment amplifié par PCR correspondant à une région très conservée des topoisomérases I eucaryotes que nous avons criblé une banque génomique de *Leishmania donovani infantum*. Quatre cosmides ont hybridé avec la sonde de 138 pb. Ces cosmides, côte-à-côte avec de l'ADN génomique du parasite, ont par la suite été analysés à l'aide d'une hybridation par la technique de Southern. Cette expérience nous révèle essentiellement qu'il existe un bon nombre de fragments communs entre l'ADN génomique et les cosmides testés, fragments qui hybrident avec la sonde de 138 pb (résultats non montrés) et nous indique également que les cosmides en question n'ont pas subi de réarrangements importants. Le cosmide ayant une proportion plus grande de fragments communs avec l'ADN génomique du parasite, soit le C₁₀29, a été utilisé pour le clonage du gène.

Le cadre de lecture ouvert contenant le gène *TOPI* de *Leishmania donovani*, ayant une longueur totale de 1905 paires de bases et codant pour une protéine de 635 acides aminés, a été analysé en tenant compte de l'usage des codons chez le parasite. Une comparaison du produit du gène *TOPI* et de la topoisomérase I humaine révèle une homologie de 54,4% et une identité de 38,4%.

La séquence (en acides aminés) de cette protéine ainsi que l'alignement de cette dernière avec celles de topoisomérases I eucaryotes connues sont présentés à la figure 11 de la page 65.

Les topoisomérases I eucaryotes sont monomériques et des études de sensibilité aux protéases avec l'équivalent humain suggèrent que cette dernière peut essentiellement être divisée en quatre domaines : un domaine N-terminal important pour la localisation nucléaire, un noyau très conservé, une région charnière peu conservée et de longueur variable, puis un domaine C-terminal (Stewart *et al.*, 1996) contenant le site actif tyrosine à l'intérieur d'un motif SKXXY conservé (Eng *et al.*, 1989; Lynn *et al.*, 1989; Shuman *et al.*, 1989). Chez la topoisomérase I humaine, il a été démontré que deux de ces domaines, le noyau et le domaine C-terminal, étaient nécessaires et suffisants pour la réalisation des activités de l'enzyme (Stewart *et al.*, 1996 et 1997; Champoux, 1998). Une analyse de la séquence du produit du gène *TOP1* nous révèle que la région correspondant au domaine N-terminal des topoisomérases IB est relativement courte, soit d'environ 10 acides aminés. Le domaine N-terminal étant peu conservé et de longueur variable parmi les topoisomérases I eucaryotes, nous l'avons exclu de l'alignement présenté à la figure 11 de la page 65 en ce qui concerne les topoisomérases I de *Homo sapiens*, de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Drosophila melanogaster*. Les 472 premiers acides aminés du cadre de lecture ouvert présentent un niveau important d'homologie avec une région des topoisomérases I eucaryotes appelée le noyau, domaine qui est important pour la liaison préférentielle de ces enzymes à une matrice d'ADN surenroulée (figure 11 de la

page 65). Curieusement, toute trace d'homologie est perdue là où devrait commencer la région charnière ou «linker» si une telle région devait exister dans la topoisomérase I du parasite. De plus, aucun motif SKXXY contenant le site actif tyrosine n'a pu être identifié.

Des études avec la topoisomérase I du virus de la vaccine (appartenant à la famille des topoisomérases IB) ont démontré l'importance du résidu H²⁶⁵ pour l'activité catalytique de l'enzyme (Petersen & Shuman, 1997). Il est intéressant de noter que cette histidine est conservée chez tous les membres de cette famille à l'intérieur d'un motif VAILCNH et qu'elle est également présente dans le produit du gène *TOP1* de *Leishmania donovani* (H⁴⁵³: figure 11 de la page 65). Chez le virus de la vaccine, cette histidine est située à 9 acides aminés du site actif tyrosine. L'intervalle entre les histidines homologues chez d'autres organismes et leur site actif respectif est variable. Cette région, appelée la région charnière ou «linker», n'est pas nécessaire à la réalisation des activités des topoisomérases IB. Il est intéressant de noter que suivant une région de disparité dans les séquences alignées, il semble y avoir un regain d'homologie vers la fin du cadre de lecture ouvert, dans la région du motif DVPIEK (D⁵⁹⁷ à K⁶⁰⁹ de la protéine, fig. 11 de la page 65).

À cette étape, trois possibilités pouvaient expliquer le phénomène observé:

- 1) une ou plusieurs mutations avait(ent) été introduite(s) dans le cosmide C₁₀29 (dans le gène *TOP1*) menant à la perte ou au remplacement de la tyrosine du site actif,
- 2) le produit du gène *TOP1* fait partie d'une nouvelle classe de

topoisomérases I qui possèdent un site actif autre que la tyrosine conventionnelle, ou 3) nous avons cloné un pseudogène.

La surexpression d'une topoisomérase active chez les bactéries est souvent nuisible, sinon létale pour celles-ci (Taylor & Menzel, 1995). Il était donc possible que nous avons cloné la seule version du gène compatible avec la survie des bactéries, soit une version mutée de la topoisomérase I du parasite. Nous avons rapidement écarté cette hypothèse en amplifiant la région 3' du gène à partir d'ADN génomique de *L. donovani* avec des oligonucléotides correspondant respectivement à une région dite conservée (F⁴⁰⁹ à S⁴¹⁵ de la protéine; voir figure 11 de la page 65) et la région 3' du gène, suivant le codon stop. Ce fragment a été séquencé et a permis de confirmer la séquence précédemment obtenue (résultats non montrés).

Aucun résidu catalytique autre que la tyrosine (site actif) n'a jusqu'à date été identifié chez les topoisomérases I eucaryotes analysées, malgré le fait que l'histidine et la cytosine ont déjà été suggérées (Wang, 1996). Puisqu'elles partagent des caractéristiques structurelles et fonctionnelles, on estime que les topoisomérases IB et les recombinases à spécificité de site dérivent d'un ancêtre commun ayant la propriété de catalyser le transfert de brins d'ADN (Cheng *et al.*, 1998). Les recombinases à spécificité de site exécutent des réactions de coupure-ligation par des transestérifications, tout comme les topoisomérases. Parmi celles-ci, la famille des intégrases catalyse ces réactions par un site actif tyrosine tandis que les résolvasse-invertases le font plutôt par l'intermédiaire d'un résidu sérine

(Sadowski, 1993). Curieusement, un résidu sérine (S⁵⁸⁰) du produit du gène *TOP1* de *L. donovani* est aligné avec les tyrosines sites actifs des autres topoisomérases I présentées à la figure 11 de la page 65.

C'est donc pour adresser l'hypothèse que le gène isolé de *Leishmania donovani* codait pour un membre d'une nouvelle famille de topoisomérases I, une qui utiliserait un site actif autre que la tyrosine conventionnelle, que nous avons cloné le gène dans un vecteur d'expression avec son propre codon ATG. Une protéine de 73,6 kDa a été partiellement purifiée (résultats non montrés), correspondant au poids moléculaire estimé par la composition en acides aminés de celle-ci. Nous avons par la suite réalisé des essais de relaxation avec une matrice d'ADN surenroulée négativement et une panoplie de conditions expérimentales. Dans chacun des cas, nous avons été incapables de détecter quelque activité de relaxation que ce soit (Broccoli *et al.*, résultats non publiés).

Un exemple d'un de ces essais de relaxation est présenté à la figure 16 dans l'annexe. Dans cet essai, 50 nanogrammes (ng) d'ADN plasmidique (pBluescript) ont été traités avec différentes dilutions d'une fraction dialysée de protéines obtenue par chromatographie. Dans la figure 16A de l'annexe, le premier puits contient l'ADN non traité. La bande du bas représente la forme surenroulée du plasmide (monomère) tandis que celle du haut représente la forme du plasmide contenant une cassure simple brin (ou « nickée »). Dans le puits voisin, le plasmide a été traité avec la topoisomérase I humaine. Nous observons une relaxation du plasmide marquée par l'apparition de bandes entre la forme surenroulée

monomérique et la forme « nickée » du plasmide. Ces bandes représentent les topoisomères (intermédiaires de surenroulement entre la forme surenroulée et la forme relaxée du plasmide monomérique). Dans la première série (puits 3 à 7), des concentrations de plus en plus élevées de l'extrait (contenant le produit du gène *TOPI* de *L. donovani*) sont utilisées dans l'essai. Aucune activité de relaxation n'est détectée. Par contre, une activité nucléasique semble copurifier avec le produit du gène *TOPI* du parasite et cette dernière semble être spécifique au simple brin puisque la forme « nickée » s'accumule préférentiellement à la forme linéaire du plasmide. Dans la seconde série (puits 8 à 12), la topoisomérase I humaine a été incluse dans l'essai pour vérifier s'il n'y avait pas quelque chose dans la fraction dialysée qui puisse inhiber l'activité des topoisomérases IB. À faible dilution, nous voyons que même la topoisomérase I humaine est inhibée. Ceci s'explique par le fait qu'à ces concentrations, l'activité nucléasique prend le dessus. Dans la figure 16B de l'annexe, les mêmes conditions ont été utilisées, mais en présence d'EDTA pour inhiber l'activité nucléasique de l'extrait. Sachant que les topoisomérases IB ne requièrent aucunement la présence de Mg^{2+} pour leurs activités, celles-ci devraient relaxer une matrice surenroulée sans problème en présence du chélateur. Dans la première série de puits (1 à 5), nous voyons que nous avons inhibé l'activité nucléasique de l'extrait puisque même à haute concentration de l'extrait, l'ADN demeure intact. Par contre, aucune activité de relaxation n'est détectée. Dans la dernière série de puits (6 à 10), nous avons inclus la topoisomérase I humaine dans l'essai et nous voyons que cette dernière est active dans ces conditions puisque nous observons la présence de topoisomères entre les formes surenroulée et « nickée » du plasmide. Plusieurs conditions de

relaxation ont été testées et dans tous les cas, la protéine codée par le gène *TOP1* demeure inactive en ce qui a trait à sa capacité à relaxer une matrice surenroulée négativement.

En 1987, Bjornsti & Wang ont démontré qu'une topoisomérase I eucaryote pouvait compléter un mutant *topA* de *E. coli* lorsque le gène de cette dernière avait été introduit dans un vecteur d'expression sous le contrôle d'un promoteur inductible, même en absence de l'inducteur. Puisque nous avons été incapables de détecter une activité de relaxation dans nos conditions *in vitro*, nous avons testé le produit du gène *TOP1* du parasite pour sa capacité à compléter un mutant *topA* de *E. coli*. Aucune complémentation n'a pu être détectée. Cette expérience soutient les résultats obtenus *in vitro* et conteste l'hypothèse voulant que la protéine catalyse la réaction de transestérification par l'intermédiaire d'un résidu autre que la tyrosine.

Afin de vérifier la troisième hypothèse, soit que nous avons cloné un pseudogène, nous avons analysé de l'ADN génomique de *Leishmania donovani* à l'aide d'une hybridation par la technique de Southern (voir figures 12 et 13 des pages 67 et 69 respectivement). Dans un premier temps, nous avons sondé les membranes avec un fragment *SacI* de 1069 paires de bases (voir fig. 10 de la p. 63) correspondant à la partie 5' du gène *TOP1*, donc la partie qui présente un niveau important d'homologie avec les topoisomérases I eucaryotes connues. Pour les enzymes de restriction testées qui ne coupaient pas dans le gène *TOP1* cloné, une seule bande hybridait avec la sonde dite 5', et pour toutes les autres enzymes

testées, les fragments prédits par la carte de restriction hybridait avec la sonde. En d'autres mots, aucun fragment additionnel à ceux prédits par la carte de restriction n'a hybridé avec le fragment *SacI* de 1069pb (voir figures 12A et 13A des pages 65 et 67 respectivement, et la carte de restriction à la figure 10 de la page 63). Ce résultat semble démentir l'hypothèse que nous avons cloné un pseudogène.

Les membranes ont par la suite été lavées et réutilisées dans une seconde hybridation par la technique de Southern, cette fois-ci en utilisant un fragment *SacI* de 750pb comme sonde, correspondant à la région 3' du gène (région peu homologue aux topoisomérases IB). Cette deuxième série d'hybridation nous révèle que les deux parties du gène (parties 5' et 3') sont contiguës puisque les mêmes fragments hybrident avec la sonde 3' que ceux qui avaient hybridé avec la sonde 5' (voir figures 12B et 13B aux pages 65 et 67 respectivement). Tous ces résultats semblent indiquer que le gène *TOP1* est réel et qu'il ne s'agit pas d'un pseudogène.

L'expression du gène *TOP1* chez *Leishmania donovani* a également été analysée à l'aide d'une hybridation par la technique de Northern. Nous avons extrait l'ARN total des parasites (promastigotes) à différents stades du cycle cellulaire. La sonde utilisée dans un premier temps était le fragment *SacI* de 1069 pb correspondant à la partie homologue aux topoisomérases IB. Une seule bande de 3,4 kb hybride avec le fragment à tous les temps testés (voir figure 14 de la page 71) et l'intensité de cette dernière augmente alors que le parasite entre en

phase exponentielle, puis elle diminue considérablement lorsque la phase stationnaire est atteinte. Le gène *TOP1* est donc préférentiellement transcrit dans les parasites en croissance. De plus, nous pouvons conclure qu'aucune forme d'épissage n'est nécessaire pour produire un messager mature puisqu'une seule bande de 3,4 kb est observée peu importe le stade du cycle cellulaire testé. Nous savons que les trypanosomes ont une façon particulière d'entreposer et d'exprimer leur information génétique. Les gènes de ces parasites semblent être dépourvus d'introns ce qui expliquerait pourquoi aucune forme d'épissage, sauf pour l'épissage en trans, n'a jusqu'à date été identifiée chez ceux-ci (Vanhamme & Pays, 1995). Nous avons par la suite répété l'expérience précédente, cette fois-ci avec la sonde 3' (fragment *SacI* de 750 pb) correspondant à la partie peu homologue aux topoisomérases IB. Ce que cette expérience révèle est que le gène *TOP1* de *Leishmania donovani* est transcrit en entier, confirmant qu'aucune forme d'épissage n'est nécessaire pour produire un messager mature. Des messagers ayant des tailles comparables à celle observée pour celui de *L. donovani* ont également été détectés chez d'autres membres de la famille des kinétoplastidae (voir figure 15 de la page 73).

Dans le contexte des résultats que nous avons obtenus, nous avons ensuite tenté d'expliquer comment le gène *TOP1* pouvait participer à une activité topoisomérase I chez le parasite. Trois possibilités sont discutées. Premièrement, il est possible que le gène en question puisse coder pour une topoisomérase I active, mais qu'aucune activité n'ait pu être détectée dans les conditions expérimentales (*in vitro* et *in vivo*) testées. Même si un site actif autre que la tyrosine

conventionnelle n'a jusqu'à ce jour été identifié, il n'en demeure pas moins que l'hypothèse est concevable. Dans ce cas, il faudrait mettre au point les conditions adéquates pour mettre l'activité de la protéine en évidence. Puisque peu de choses sont connues sur ces parasites en ce qui concerne les mécanismes moléculaires impliqués dans l'expression des gènes, une seconde possibilité est qu'une forme inconnue (et à ce jour non définie) de modification post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle a lieu chez *L. donovani* afin de produire une enzyme fonctionnelle. D'ailleurs, la protéine inactive que nous avons partiellement purifié présente un poids moléculaire de 73,6 kDa tandis que l'activité topoisomérase I isolée d'extraits cellulaires de *L. donovani* par Chakraborty *et al.* en 1993, était attribuée à une protéine de 67 kDa. La dernière hypothèse est que le site actif de la topoisomérase I de *L. donovani* serait porté par une seconde sous-unité, codée par un gène autre que le gène *TOP1*. Il a été démontré que l'activité de la topoisomérase I humaine pouvait être reconstituée *in vitro* par l'association du noyau et de fragments de taille différentes du domaine C-terminal de cette dernière (Stewart *et al.*, 1997). D'ailleurs, Park *et al.* ont dernièrement employé le système à deux hybrides dans le but d'identifier des protéines pouvant interagir avec le noyau central conservé de la topoisomérase I de *Saccharomyces cerevisiae*. Par cette technique, ces derniers ont isolé plusieurs fragments contenant des régions différentes du domaine C-terminal de cette enzyme. Aucun de ces fragments ne chevauchait la région du noyau. De plus, la coexpression de ces deux domaines chez la levure a permis la complémentation partielle de mutants dépourvus d'une activité topoisomérase I et des essais *in vitro* ont confirmé la restauration de cette activité.

Une simple expérience de co-immunoprécipitation avec des anticorps dirigés contre le produit du gène *TOPI* (possiblement le noyau de l'enzyme) pourrait donc répondre à cette question. Ces mêmes anticorps pourraient également servir à localiser l'activité dans le parasite. Nous savons qu'une activité topoisomérase I a été détectée dans le kinétoplaste de certains trypanosomes (Shapiro & Englund, 1990). Il est encore inconnu si cette dernière est conférée par la même topoisomérase I qui est présente dans le noyau, ou si une enzyme distincte est produite dans cette structure interne, particulière aux kinétoplastes. Il serait également intéressant de reprendre l'expérience de Park *et al.*, soit la technique des deux hybrides chez *Leishmania donovani* afin de vérifier si un (ou des) peptide(s) quelconque(s) interagit(issent) avec le produit du gène *TOPI* du parasite. Une autre expérience importante à réaliser serait l'inactivation du (ou des) gène(s) codant pour la topoisomérase I de *L. donovani* et d'en vérifier les conséquences pour la survie du parasite. Une banque de cDNA de *L. donovani* a dernièrement été clonée dans un vecteur d'expression à faible nombre de copies par le Dr. B. Papadopoulou du CHUL à Ste-Foy. Il serait également intéressant de transformer cette banque dans nos mutants *topA* de *E. coli* et d'analyser le(s) clone(s) qui semble(nt) compléter ces mutants.

4. CONCLUSION

Nous avons cherché à isoler le gène codant pour la topoisomérase I de *Leishmania donovani*. Nous avons cloné un cadre de lecture ouvert de 1905 paires de bases codant pour une protéine de 635 acides aminés. Cette dernière présente un taux d'identité de 54,4% et un taux d'homologie de 38,4% avec la topoisomérase I humaine, dans une région nommée le noyau de l'enzyme. Le produit du gène *TOP1* ne possède pas un site actif tyrosine conventionnel à l'intérieur d'un motif SKXXY conservé, et il ne présente aucune activité de relaxation. Le gène *TOP1* est un gène réel, et il est exprimé de façon préférentielle chez les parasites en croissance.

En conclusion, nous savons que *Leishmania donovani* possède une activité topoisomérase I et que le gène *TOP1* n'est pas un pseudogène. Nous pouvons donc supposer que ce dernier participe d'une manière ou d'une autre à cette activité. Ce n'est qu'en répondant à ces différentes questions que nous pourrions par la suite évaluer la vulnérabilité de ces parasites face aux traitements antiprotozoaires visant à transformer la topoisomérase I des trypanosomes en poison cytotoxique.

5. RÉFÉRENCES

Abelson, H.T., and Penman, S. (1972) Selective interruption of high molecular weight RNA synthesis in Hela cells by camptothecin. *Nature*. **237**, 144-146.

Andoh, T., Ishii, K., Suzuki, Y., Ikegami, Y., Kusunoki, Y., *et al.* (1987) Characterization of a mammalian mutant with a camptothecin resistant DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 5565-5569.

Ashford, R.W., Desjeux, P., and deRaadt, P. (1992) Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitol. Today*. **8**, 104-105.

Bender, K., Betschart, B., and Hecker, H. (1992) Histone-DNA interactions in the chromatin of procyclic *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasitol. Res.* **78**, 495-500.

Benedetti, P., Fiorani, P., Capuani, L., and Wang, J.C. (1993) Camptothecin resistance from a single mutation changing glycine-363 of human topoisomerase I to cystein. *Cancer. Res.* **53**, 4343-4348.

Benjamini, E., and Leskowitz, S. (1991) *Immunology-A short course*, Second Edition, Wiley-Liss, NY, 459 pp.

Benne, R. (1990) RNA editing in trypanosomes: is there a message? *Trends Genet.* **6**, 177-181.

Berman, J.D. (1988) Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficiency, and future strategies. *Rev. Infect. Dis.* **10**, 560-586.

Bjornsti, M.A., and Wang, J. (1987) Expression of yeast DNA topoisomerase I can complement a conditional-lethal DNA topoisomerase I mutation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 8971-8975.

Bodley, A.L., and Shapiro, T.A. (1995a) Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on trypanosomes and *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 3726-3730.

Bodley, A.L., Wani, M.C., Wall, M.E., and Shapiro, T.A. (1995b) Antitrypanosomal activity of camptothecin analogs: structure-activity correlations. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 937-942.

Borst, P. (1986) Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 701-732.

Bosmann, H.B. (1970) Camptothecin inhibits macromolecular synthesis in mammalian cells but not in isolated mitochondria or *E. coli*. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **41**, 1412-1420.

Bray, R.S. (1983a) *Leishmania mexicana mexicana*: attachment and uptake of promastigotes to and by macrophages *in vitro*. *J. Protozool.* **30**, 314-322.

Bray, R.S. (1983b) *Leishmania*: chemotactic responses of promastigotes and macrophages *in vitro*. *J. Protozool.* **30**, 322-329.

Brown, S.D., Huang, J., and van der Ploeg, L.H.T (1992) The promoter for the procyclic acidic repetitive protein (PARP) genes of *Trypanosoma brucei* shares features with RNA polymerase I promoters. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2644-2652.

Bryceson, A.D.M., Chulay, J.D., Mugambi, M., Were, J.B., Gachihi, G., Chunge, C.N., Muigai, R., Bhatt, S.M., Ho, M., Spencer, H.C., Meme, J., and Anabwani, G. (1985) Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. II. Response to high-dose sodium stibogluconate or prolonged treatment with pentamidine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**, 705-714.

Burri, C., Bodley, A.L., and Shapiro, T.A. (1996) Topoisomerases in kinetoplastids. *Parasitol. Today*. **12**, 226-231.

Chakraborty, A.K., and Mujumder, H.K. (1988) Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochem. Biophys. Res.* **152**, 605-611.

Chakraborty, A.K., Gupta, A., and Mujamder, H.K. (1993) A type I DNA topoisomerase from the kinetoplast hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Indian J. Biochem. Biophys.* **30**, 257-263.

Champoux, J.J., and Dulbecco, R. (1972) An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA-A possible swivel for DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 143-146.

Champoux, J.J. (1981) DNA is linked to the rat liver DNA nicking-closing enzyme by a phosphodiester bond to tyrosine. *J. Biol. Chem.* **256**, 4805-4809.

Champoux, J.J. (1998) Domains of human topoisomerase I and associated functions. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **60**, 111-132.

Chang, K.-P., and Dwyer, D.M. (1976) Multiplication of human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages *in vitro*. *Science*. **193**, 678-680.

Chang, K.-P. (1978) *Leishmania* infection of human skin fibroblasts *in vitro*: absence of phagolysosomal fusion after induced phagocytosis of promastigotes, and their intracellular transformation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**, 1084-1096.

Chang, K.-P. (1983) Cellular and molecular mechanisms of intracellular symbiosis in leishmaniasis. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* **14**, 267-302.

Chang, K.P., Fong, D., and Bray, R.S. (1985) *Leishmaniasis*. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), p. 3.

Chen, A.Y., Chiang, Y., Gatto, B., and Liu, L.F. (1993a) DNA minor groove-binding ligands: a different class of mammalian DNA topoisomerase I inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 8131-8135.

Chen, A.Y., Yu, C., Bodley, A., Peng, L.F., and Liu, L.F. (1993b) A new mammalian DNA topoisomerase I poison Hoechst 33342: cytotoxicity and drug resistance in human cell cultures. *Cancer Res.* **53**: 1332-1337.

Chen, A.Y., and Liu, L.F. (1994) DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**, 191-218.

Cheng, C., Kussie, P., Pavletich, N., and Shuman, S. (1998) Conservation of structure and mechanism between eukaryotic topoisomerase I and site-specific recombinases. *Cell.* **92**, 841-850.

Chung, H.-M., Lee, M.G.-S., and van der Ploeg, L.H.T. (1992) RNA polymerase I-mediated protein-coding gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Today.* **8**, 414-418.

Covey, J.M., Jaxel, C., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (1989) Protein-linked DNA strand breaks induced in mammalian cells by camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I. *Cancer. Res.* **49**, 5016-5022.

Croft, S.L. (1988) Recent developments in chemotherapy of leishmaniasis. *Trends Pharmacol. Sci.* **9**, 376-381.

Cruz, A.K., Titus, R., and Beverly, S.M. (1993) Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 1599-1603.

D'Arpa, P., Beardmore, C., and Liu, L.F. (1990) Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase I poisons. *Cancer. Res.* **50**, 6919-6924.

Descôteaux, A., Garraway, L.A., Ryan, K.A., Garrity, L.K., Turco, S.J. and Beverly, S.M. (1994) Identification of genes by functional complementation in protozoan parasite *Leishmania*. *Methods in Molecular genetics*. Volume 3, Academic Press, 22-47.

Dickerson, R.E. (1989a) Definition and nomenclature of nucleic acid structure components. *Nucl. Acids Res.* **17**, 1797-1803.

Dickerson, R.E., (1989b) Definition and nomenclature of nucleic acid structure parameters. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **6**, 627-634.

Donovan, C. (1903) The etiology of one of the heterogeneous fevers of India, *Brit. Med. J.* **ii**, p. 1401.

Douc-Rasy, S., Kayser, A., and Riou, G.F. (1984) Inhibition of the reactions catalysed by a type I topoisomerase and a catenating enzyme of *Trypanosoma cruzi* by DNA-intercalating drugs. *EMBO J.* **3**, 11-16.

Drlica, K., and Franco, R.J. (1988) Inhibitors of DNA topoisomerases. *Biochem.* **27**, 2253-2259.

Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, É., Liu, L.F., and Crouch, R.J. (1995) Overexpression of RNaseH partially complements the growth defect of an *Escherichia coli topA* mutant : R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 3526-3530.

Eng, W., Pandit, S.D., and Sternglanz, R. (1989) Mapping of the active site tyrosine of eukaryotic DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **262**, 13373-13376.

England, P.T. (1981) in *Biochemistry and Physiology of Protozoa* (Levandowsky, M. and Hutner, S.H.) Vol. 4, Academic Press, New York, pp 334-384.

Faust, E.C., and Russel, P.F. (1964) *Craig and Faust's clinical parasitology*. Seventh edition, Lea & Febinger, Philadelphia, 1099 pp.

Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., and Nash, H. (1976) DNA gyrase-an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 3872-3876.

Gilbert, D.E., and Feigon, J. (1991) Structural analysis of drug-DNA interaction. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**, 439-445.

Gottlieb, J.A., Guarino, A.M., Call, J.B., Oliviero, V.T., and Block, J.B. (1970) Preliminary pharmacological and clinical evaluation of camptothecin sodium (NSC-100880). *Cancer Chemother. Rep.* **54**, 461-470.

Hadjuk, S.L. (1978) Influence of DNA complexing compounds on the kinetoplast of trypanosomatids. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **6**, 158-200.

Hecker, H., Betschart, B., Bender, K., Burri, M., and Schlimme, W. (1994) The chromatin of trypanosomes. *Int. J. Parasitol.* **24**, 809-819.

Horwitz, S.B., Chang, C.-K., and Grollman, A.P. (1971a) Studies on camptothecin: effects on nucleic acid and protein synthesis. *Mol. Pharmacol.* **7**, 632-644.

Horwitz, M.S., and Horwitz, S.B. (1971b) Intracellular degradation of Hela and adenovirus type 2 DNA induced by camptothecin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 723-727.

Horwitz, S.B., and Horwitz, M.S. (1973) Effects of camptothecin on the breakage and repair of DNA during the cell cycle. *Cancer Res.* **33**, 2834-2836.

Hsiang, Y.-H., Hertzberg, R., Hecht, S., and Liu, L.F. (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **260**, 14873-14878.

Hsiang, Y.-H., and Liu, L.F. (1988) Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Res.* **48**, 1722-1726.

Hsiang, Y.-H., Lihou, M.G., and Liu, L.F. (1989) Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable-complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res.* **49**, 5077-5082.

Huang, W.M. (1986) The 52-protein subunit of T4 DNA topoisomerase is homologous to the GyrA-protein of gyrase. *Nucleic Acids Res.* **14**, 7379-7390.

Huang, W.M., Libbey, J.L., van der Hoeven, P., and Yu, S.X. (1998) Bipolar localization of *Bacillus subtilis* topoisomerase IV, an enzyme required for chromosomal segregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 4652-4657.

Iovannisci, D.M., Kaur, K., Young, L., and Ullman, B. (1984) Genetic analysis of nucleoside transport in *Leishmania donovani*. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1013-1019.

Iovannisci, D.M., and Beverly, S.M. (1989) Structural alterations of chromosomes in *Leishmania major* as evidence for diploidy, including spontaneous amplification of the mini-exon array. *Mol. Biochem. Parasitol.* **34**, 177-188.

Kessel, D. (1971) Effects of camptothecin on RNA synthesis in leukemia L1210 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **246**, 225-232.

Kessel, D., Bosmann, H.B., and Lohr, K. (1972) Camptothecin effects on DNA synthesis in murine leukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **269**, 210-216.

Kim, J.S., Sun, Q., Gatto, B., Chiang, Y., Liu, A., Liu, L.F., and LaVoie, E.J. (1996) Structure-activity relationships of benzimidazoles and related heterocycles as topoisomerase I poisons. *Bioorg. Med. Chem.* **4**, 621-630.

Knab, A.M., Fertala, J., and Bjornsti, M.-A. (1993) Mechanisms of camptothecin resistance in yeast DNA topoisomerase I mutants. *J. Biol. Chem.* **268**, 22322-22330.

Kornberg, A., and Baker, T.A. (1992) *DNA replication*. Second Edition, W.H. Freeman and Company, New York, 931 pp.

Kubota, N., Kanzawa, F., Nishio, K., Takeda, Y., Ohmori, T., Fujiwara, Y., Terashima, Y., and Saijo, N. (1992) Detection of a topoisomerase I gene point mutation in CPT-11 resistant lung cancer cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 571-577.

Leishman, W. (1903) On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in *India*. *Brit. Med. J. i*, 1252-1254.

Lewin, B., (1994) *Genes V*. Oxford University Press, New York, 1272 pp.

Li, L.H., Fraser, T.J., Olin, E.J., and Bhuyan, B.K. (1972) Action of camptothecin on mammalian cells in culture. *Cancer Res.* **32**, 2643-2650.

Liu, L.F., Liu, C.C., and Alberts, B.M. (1980) Type II topoisomerases: enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break. *Cell.* **19** 697-707.

Liu, L.F., and Wang, J.C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 7024-7027.53.

Liu, L.F. (1994a) DNA topoisomerases: biochemistry and molecular biology. *Advances in pharmacology*. Vol. 29A, Boca Raton, Academic Press, U.S.A., 320 pp.

Liu, L.F. (1994b) DNA topoisomerases: biochemistry and molecular biology. *Advances in pharmacology*. Vol. 29B, Boca Raton, Academic Press, U.S.A., 320 pp.

Lynn, R., Giaever, G., Swanberg, S.L., and Wang, J.C. (1986) Tandem regions of yeast DNA topoisomerase II share homology with different subunits of bacterial gyrase. *Science.* **233**, 647-649.

Lynn, R.M., Bjornsti, M., Caron, P.R., and Wang, J.C. (1989) Peptide sequencing and site directed mutagenesis identify tyrosine-727 as the active site tyrosine of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 3559-3563.

Massé, É., Phoenix, P., and Drolet, M. (1997) DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rrnB* operon in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **19**, 12816-12823.

Melendy, T., and Ray, D.S. (1987) Purification and nuclear localization of a type I topoisomerase from *Crithidia fasciculata*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **24**, 215-225.

Meshnick, S.R., and Eaton, J.W. (1981) Leishmanial superoxyde dismutase: a possible target for chemotherapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **102**, 970-976.

Muggia, F.M., Creaven, P.J., Hansen, H.H., Cohen, M.H., and Selawry, O.S. (1972) Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptothecin (NSC- 100880): correlation with preclinical studies. *Cancer. Chemother. Rep. Part I.* **56**, 515-521.

Murphy, W.J., Watkins, K.P., and Agabian, N. (1986) Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: evidence for *trans*-splicing. *Cell.* **47**, 517-525.

Neidle, S., Pearl, L.H., and Skelly, J.V. (1987) DNA structure and perturbation by drug binding. *Biochem. J.* **243**, 1-13.

Obexer, W., Schmid, C., Barbe, J., Galy, J.P. and Brun, R. (1995) Activity and structure relationship of acridine derivatives against African trypanosomes. *Trop. Med. Parasitol.* **46**, 49-53.

Ouellette, M., and Papadopoulou, B. (1993) Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. *Parasitol. Today.* **9**, 150-153.

Ouellette, M., Papadopoulou, B., et Olivier, M. (1997) Nouveaux aspects moléculaires et cellulaires du parasite *Leishmania*. *Médecine/Science.* **13**, 934-941.

Park, S.M. and Koo, H.-S. (1994) Purification of *Caenorhabditis elegans* DNA topoisomerase I. *Biochem. et Biophys. Acta* **1219**, 47-54.

Petersen, B.F., and Shuman, S. (1997) Histidine 265 is important for covalent catalysis by vaccinia topoisomerase and is conserved in all eukaryotic type I enzymes. *J. Biol. Chem.* **7**, 3891-3896.

Phoenix, P., Raymond, M.-A., Massé, É., and Drolet, M. (1997) Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **3**, 1473-1479.

Pilch, D.S., Xu, Z., Sun, Q., LaVoie, E.J., Liu, L.F., and Breslauer, K.J. (1997) A terbenzimidazole that preferentially binds and conformationally alters structurally distinct DNA duplex domains: a potential mechanism for topoisomerase I poisoning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 13565-13570.

Prescott, L., Harley, H.P., and Klein, D.A. (1995) *Microbiologie*. De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles, 1014 pp.

Redinbo, M.R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J.J. and Hol, W.G.J. (1998) Crystal structure of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science*. **279**, 1504-1513.

Reed, S.G. (1995) Cytokine control of the macrophage parasites *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. In *Molecular Approaches to Parasitology*. Wiley- Liss, Inc., 443-453.

Riou, G.F., Gabillot, M., Douc-Rasy, S., Kayser, A., and Barrois, M. (1983) A type I DNA topoisomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* **134**, 479-484.

Rubin, E., Panayotis, P., Bharti, A., Toppmeyer, D., Giovanella, B., and Kufe, D. (1994) Identification of a mutant human topoisomerase I with intact catalytic activity and resistance to 9-nitro-camptothecin. *J. Biol. Chem.* **269**, 2433-2439.

Rudenko, G., Lee, M.G.-S., and van der Ploeg, L.H.T. (1992) The PARP and VSG genes of *Trypanosoma brucei* do not resemble RNA polymerase II transcription units in sensitivity to sarkosyl in nuclear run-on assays. *Nucleic Acids Res.* **20**, 303-306.

- Sadowski, P.D. (1993) Site-specific genetic recombination : hops, flips, and flops. *FASEB J.* **7**, 760-767.
- Scholler, J.K., Reed, S.G., and Stuart, K. (1986) Molecular karyotype of species and subspecies of *Leishmania*. *Mol. and Biochem. Parasitol.* **20**, 279-293.
- Sekiguchi, J., Seeman, N.C., and Shuman, S. (1996) Resolution of Holliday junctions by eukaryotic DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 785-789.
- Sekiguchi, J., and Shuman, S. (1997) Site-specific ribonuclease activity of eukaryotic DNA topoisomerase I. *Mol. Cell.* **1**, 89-97.
- Shapiro, T., and Englund, P.T. (1990) Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 950-954.
- Sherrat, D., and Wigley, D.B. (1998) Conserved themes but novel activities in recombinases and topoisomerases. *Cell.* **93**, 149-152.
- Shuman, S., Golder, M., and Moss, B. (1988) Characterization of vaccinia virus DNA topoisomerase I expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**, 16401-16407.
- Shuman, S., Kane, E.M., and Morham, S.G. (1989) Mapping the active site tyrosine of vaccinia virus DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 9793-9797.
- Simpson, L. (1973) Structure and function of kinetoplast DNA. *J. Protozool.* **20**, 2-8.
- Simpson, L. (1990) RNA editing-a novel genetic phenomenon? *Science.* **250**, 512-513.

Sinden, R.R. (1994) *DNA structure and function*. Academic Press, San Diego, California, U.S.A, 398 pp.

Stewart, L., Ireton, G.C., and Champoux, J.J. (1996) The domain organization of human topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **271**, 7602-7608.

Stewart, L., Ireton, G.C., and Champoux, J.J. (1997) Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation. *J. Mol. Biol.* **269**, 355-372.

Stuart, K., and Feagin, J.E. (1992) Mitochondrial DNA of kinetoplastids. *Int. Rev. Cytol.* **141**, 65-88.

Stuart, K., Allen, T.E., Heidmann, S., and Seiwert, S.D. (1997) RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Microb. & Mol. Microb. Rev.* **1**, 105-120.

Sugimoto, Y., Tsukahara, S., Oh-hara, T., Isoe, T., and Tsuruo, K. (1990) Decreased expression of DNA topoisomerase I in camptothecin-resistant tumor cell lines as determined by a monoclonal antibody. *Cancer Res.* **50**, 6925-6930.

Sun, Q., Gatto, B., Chiang, Y., Liu, A., Liu, L.F., and LaVoie, E.J. (1995) Synthesis and evaluation of terbenzimidazoles as topoisomerase I inhibitors. *J. Med. Chem.* **38**, 3638-3644.

Sutton, R.E., and Boothroyd, J.C. (1986) Evidence for *trans*-splicing in trypanosomes. *Cell.* **47**, 527-535.

Tamura, H., Kohchi, C., Yamada, R., Ikeda, T., Koiwai, O., Patterson, E., Keene, J., Okada, K., Kjeldsen, E., Nishikawa, K., and Andoh, T. (1990) Molecular cloning of a cDNA of a camptothecin-resistant human DNA topoisomerase I and identification of mutation sites. *Nucl. Ac. Res.* **19**, 69-75.

Tanizawa, A., Bertrand, R., Kohlhagen, G., Tabuchi, A., Jenkins, J., and Pommier, Y. (1993) Cloning of chinese hamster DNA topoisomerase I cDNA and identification of a single point mutation responsible for camptothecin resistance. *J. Biol. Chem.* **268**, 25463-25468.

Taylor, S.T., and Menzel, R (1995) The creation of a camptothecin-sensitive *Escherichia coli* based on the expression of the human topoisomerase I. *Gene* **167**, 69-74.

Thakur, C.P. (1986) Harmful effect of high stibogluconate treatment of kala-azar in India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80**, 672-673.

Tsao, Y-P, Wu, H-Y, and Liu, L.F. (1989) Transcription-driven supercoiling of DNA: direct biochemical evidence from *in vitro* studies. *Cell.* **56**, 111-118.

Turco, S.J., and Descôteaux, A. (1992) The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 65-94.

Uemura, T., Morikawa, K., and Yanagida, M. (1986) The nucleotide sequence of the fission yeast DNA topoisomerase II gene: structural and functional relationships to other DNA topoisomerases. *EMBO J.* **5**, 2355-2361.

Vanhamme, L., and Pays, E. (1995) Control of gene expression in trypanosomes. *Micro. Rev.* **2**, 223-240.

Wall, M.E., Wani, M.C., Cooke, C.E., Palmer, K.H., McPhail, A.T., *et al.* (1966) Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 3888-3890.

- Wang, J.C. (1971) Interaction between DNA and *Escherichia coli* protein ω . *J. Mol. Biol.* **55**, 523-533.
- Wang, J.C. (1996) DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 635-692.
- Wani, M.C., Nicholas, A.W., Manikumar, G., and Wall, M.E. (1987) Plant antitumor agents. Total synthesis and antileukemic activity of ring A substituted camptothecin analogues. *J. Med. Chem.* **30**, 1774-1779.
- Watson, J.D., and Crick, F.H.C. (1953) Molecular structure of nucleic acids—a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature (London)*. **171**, 737-738.
- Werbovetz, K.A., Lehnert, E.K., Macdonald, T.L., and Pearson, R.D. (1992) Cytotoxicity of acridine compounds for *Leishmania* promastigotes *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 495-497.
- Werbovetz, K.A., Spoor, P.G., Pearson, R.D., and Macdonald, T.L. (1994) Cleavable-complex formation in *Leishmania chagasi* treated with anilinoacridines. *Mol. Biochem. Parasitol.* **65**, 1-10.
- World Health Organization (1984) Geographical distribution of foci of *Leishmania*. *WHO Tech. Rep. Ser.* **701**, 23-54.
- Wu, R.S., Kumar, A., and Warner, J.R. (1971) Ribosome formation is blocked by camptothecin, a reversible inhibitor of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68**, 3009-3014.
- Wu, H-Y, Shyy, S., Wang, J.C., and Liu, L.F. (1988) Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell*. **53**, 433-440.

Wyckoff, E., Natalie, D., Nolan, J.M., Lee, M., and Hsieh T-S. (1989) Structure of the *Drosophila* DNA topoisomerase II gene. Nucleotide sequence and homology among topoisomerases II. *J. Mol. Biol.* **205**, 1-14.

Yamashita, Y., Fujii, N., Murakaya, C., Ashizawa, T., Okabe, M., and Nakano, H., (1992) Induction of mammalian DNA topoisomerase-mediated DNA cleavage by Liu, 1994b antitumor Indolocarbazole Derivatives. *Biochemistry.* **31**, 12069-12075.

Yeh, Y.-C., Liu, H.-F., Ellis, C.A., and Lu, A.-L. (1994) Mammalian topoisomerase I has base mismatch nicking activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 15498-15504.

Zhu, J., and Schiestl, R.H. (1996) Topoisomerase I involvement in illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1805-1812.

Zilberstein, D., Sheppard, H.W., and Dwyer, D.M. (1987) The plasma membrane H⁺-ATPase of *Leishmania donovani* promastigotes. *Host-Parasite Cellular and Molecular Interactions in Protozoal Infections.* ed. KP Chang, DH Snary Berlin, Springer-Verlag, **11**, 183-188.

Zilberstein, D., and Dwyer, D.M. (1988) Identification of a surface membrane proton-translocating ATPase in promastigotes of the parasite protozoan *Leishmania*. *Biochem. J.* **256**, 13-21.

Zilberstein, D. (1993) Adaptation of *Leishmania* species to an acidic environment, *Biochemical Protozoology*, ed. GH Coombs, MJ North, London/Washington DC, Taylor and Francis, 349-358.

Zilberstein, D., and Shapira, M. (1994) The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 449-470.

6. ANNEXE

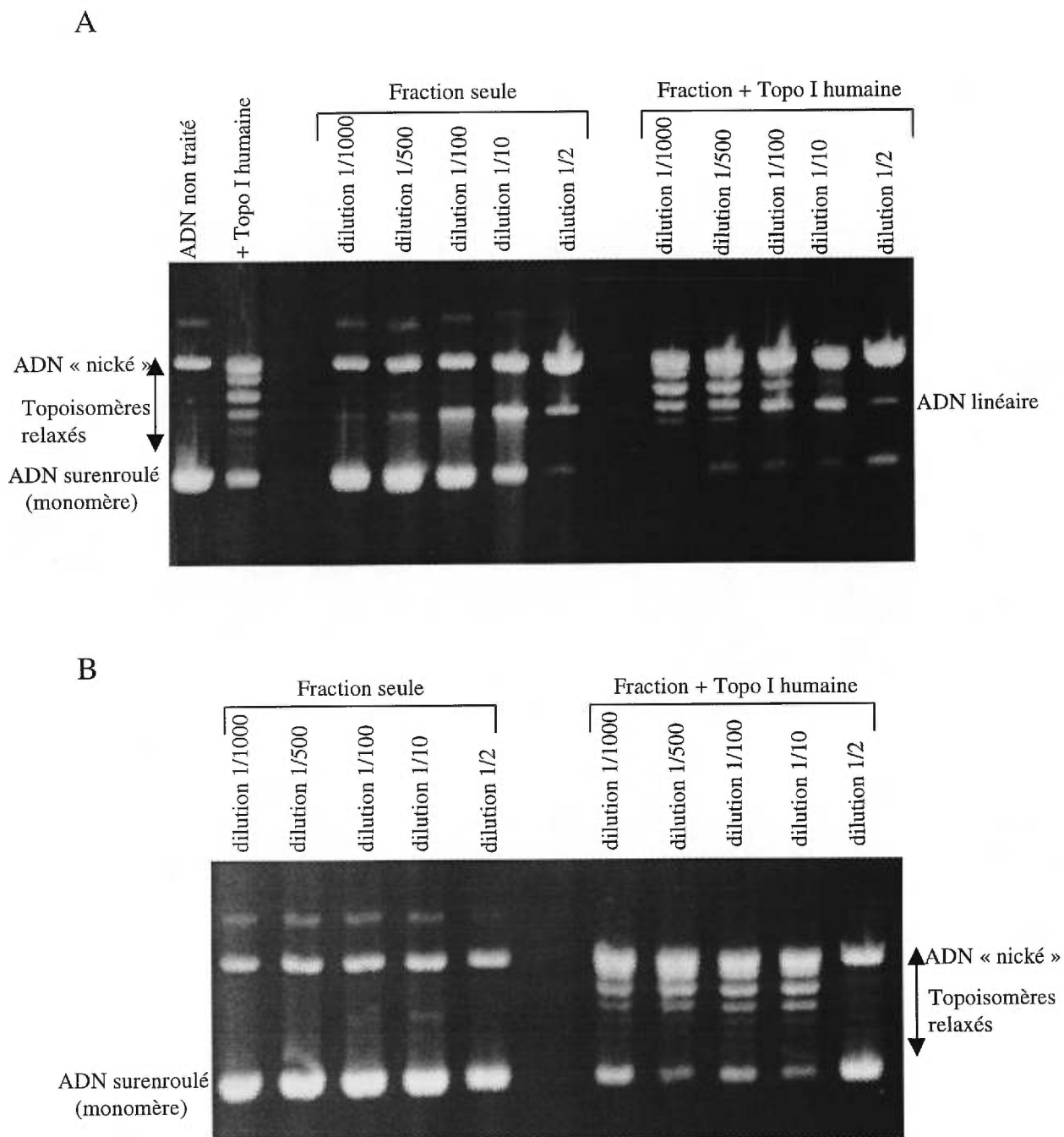


Figure 16: Essais de relaxation avec des dilutions différentes d'une fraction dialysée du produit du gène *TOPI* obtenue par chromatographie et une matrice d'ADN circulaire surenroulé. A) En absence d'EDTA B) En présence d'EDTA

7. REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier le **Dr. Marc Drolet** d'avoir eu confiance en moi et d'avoir accepté que je fasse partie de son équipe. Merci également au **Dr. Martin Olivier** et à son étudiant **Jean-François Marquis** pour le travail qu'ils ont réalisé sur l'aspect *in vivo* de ce projet. Je tiens aussi exprimer ma reconnaissance envers le **Dr. Albert Descôteaux** qui m'a accueilli à plusieurs reprises dans son laboratoire.

Merci à tous les autres membres de l'équipe pour l'ambiance qu'ils mettent dans le laboratoire: à **Éric** (tu seras toujours LE maître du laboratoire), merci pour ta patience et pour tes bons conseils; à **Josiane** et à **Chadi**, merci pour toutes les bonnes discussions (scientifiques et autres...).

Merci également à **Josée Prévost** qui m'a beaucoup aidé à démarrer ce projet et à l'irremplaçable **Pauline Phoenix**...merci pour ta patience, tes conseils, ta confiance et surtout pour ton amitié.

Je ne pourrais oublier l'unique **Gary**...merci pour toutes les fois où tu m'as laissé gagner au pool. Malgré les apparences, t'es un gars ben correct...

To **Martin** (alias: LEGO man), thank you for always listening to my every word, for always letting me take the last soup and for remembering the cinnamon hearts...Thanks for being such a good friend.

À **Francis** (alias: Francesco), je ne pourrais énumérer en si peu d'espace toutes les choses que tu as fait pour moi et que tu continues à faire quotidiennement. Merci tout simplement pour le temps que tu m'accordes même quand tu n'en as pas beaucoup...

À **Alexandre** (alias: Big Al), merci de m'avoir fait connaître le lac Nominique (un vrai paradis sur terre); merci également pour ta générosité et ta sincérité.

À **Jonathan** (alias: Djo), merci pour tous tes encouragements et pour la confiance que tu as en moi. Thank you for taking such good care of me.

To **Patricia**, thank you for being there every time something important happens to me, and for being such a good friend, even when nothing does.

To my dearest uncle **Al**, thank you for always having faith in me.

A **Nonna**, grazie per tutto quello che fai per me.

Un gros merci à mes parents **Giuseppe** et **Maria** qui m'ont toujours encouragé dans tous mes projets (même les plus farfelus), et qui m'ont appris qu'avec un peu d'espoir et beaucoup de persévérance, on peut accomplir bien des choses...