

Université de Montréal

Étude protéomique des facteurs de virulence
de *Leishmania donovani*

par

Karine Bernard

Département de pathologie et biologie cellulaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)
en pathologie et biologie cellulaire

Août 2001

© Karine Bernard, 2001



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Étude protéomique des facteurs de virulence
de *Leishmania donovani*

présenté par:

Karine Bernard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Docteur Roger Lippé
président-rapporteur

Docteur Michel Desjardins
directeur de recherche

Docteur Albert Descoteaux
membre du Jury

SOMMAIRE

Leishmania donovani est l'un des agents responsables de la leishmaniose de type viscéral qui cause la mort de milliers de personnes. Les leishmanies sont des parasites biphasiques, i.e. qu'on les retrouve sous deux stades distincts, promastigotes (dans le tractus alimentaire de la mouche des sables femelle) et amastigotes (dans le phagolysosome de son hôte vertébré), caractérisés par un environnement, une morphologie ainsi que des caractères biochimiques propres à chacun. Les modulations biochimiques qui ont lieu lors de cette différenciation du promastigote en amastigote et qui permettent à ce dernier de survivre dans l'environnement hostile qu'est le phagolysosome sont largement inconnus. L'utilisation d'un système de différenciation *in vitro*, qui mime les conditions présentes *in vivo*, nous a permis d'obtenir des amastigotes axéniques semblables à ceux isolés de lésions animales. Des essais de survie dans les macrophages révèlent que les amastigotes axéniques obtenus sont plus aptes à survivre que les promastigotes, ce qui suggère l'acquisition de protéines de virulence. Une étude protéomique en gel 2D nous a en effet permis d'observer plusieurs protéines exprimées différemment entre les deux stades. L'identification de ces protéines a été réalisée par spectrométrie de masse.

Mots clés

Leishmania, macrophage, protéines de virulence, protéomique, gel 2D.

SUMMARY

Leishmania donovani is one of the causative agents of visceral leishmaniasis that causes the death of thousands of people. The leishmania are biphasic parasites, which means they're found under two distinct stages: promastigotes (in the gut of the female sandfly) and amastigotes (in the phagolysosome of the vertebrate host), each characterized by their own environment, morphology and biochemical properties. The biochemical modulations that happen during the differentiation of promastigote to amastigote and permit the survival of the parasite in the hostile environment of the phagolysosome are still unclear. The utilisation of an *in vitro* differentiation system that mimics the *in vivo* conditions allowed us to obtain axenic amastigotes similar to those isolated from animal lesions. Survival experiments revealed that axenic amastigotes are more able than promastigotes to survive in the macrophage, which suggests the acquisition of virulence factors. A proteomic study using 2D gel electrophoresis allowed us to see many proteins differentially expressed in the two phases. These proteins were identified by mass spectrometry.

Keywords

Leishmania, macrophage, virulence proteins, proteomic, 2D gel electrophoresis.

TABLE DES MATIÈRES

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL.....	i
UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
SUMMARY.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	x
INTRODUCTION.....	1
1 PHYLOGENÈSE.....	1
2 LE VECTEUR.....	4
3 CYCLE DE DIFFÉRENCIATION DU GENRE <i>LEISHMANIA</i> DE PROMASTIGOTE EN AMASTIGOTE.....	6
4 MANIFESTATIONS CLINIQUES DES LEISHMANIOSES.....	9
4.1 LEISHMANIOSE CUTANÉE.....	9
4.2 LEISHMANIOSE MUCOCUTANÉE.....	10
4.3 LEISHMANIOSE VISCÉRALE.....	10
5 HISTORIQUE ET ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA LEISHMANIOSE VISCÉRALE.....	15
5.1 HISTORIQUE.....	15
5.2 ÉPIDÉMIOLOGIE.....	15
6 TRAITEMENTS DE LA LEISHMANIOSE VISCÉRALE.....	16
7 SÉQUENÇAGE GÉNOMIQUE DE <i>LEISHMANIA MAJOR</i>.....	17
8 ORGANISATION STRUCTURELLE DES LEISHMANIES.....	17
9 BIOGENÈSE DES PHAGOLYSOSOMES ET SURVIE DES MICROORGANISMES DANS LES MACROPHAGES.....	21
9.1 PHAGOCYTOSE.....	21
9.1.1 <i>Composition biochimique de la vacuole parasitaire contenant les leishmanies.....</i>	<i>23</i>
9.1.2 <i>Mécanismes élaborés par les microorganismes pour survivre à l'intérieur des macrophages.....</i>	<i>23</i>
9.2 COMPOSÉS OXYGÈNE TOXIQUES.....	27
10 PRINCIPALES MOLÉCULES IMPLIQUÉES DANS LA VIRULENCE DES LEISHMANIES.....	29
10.1 GLYCOCONJUGUÉS.....	29

10.1.1	<i>Lipophosphoglycan (LPG)</i>	29
10.1.2	<i>Leishmanolysine (GP63)</i>	32
10.2	ANTIOXYDANTS	35
10.3	CHAPERONES	37
10.4	AUTRES MODULATIONS DU SYSTÈME IMMUNITAIRE PERMETTANT LA SURVIE DES LEISHMANIES.....	38
11	CULTURE <i>IN VITRO</i>	40
12	EXPRESSION GÉNIQUE ET PROTÉIQUE DIFFÉRENTIELLE ENTRE PROMASTIGOTE ET AMASTIGOTE DE <i>LEISHMANIA DONOVANI</i>	41
12.1	ÉQUIPE DE JOSHI ET COLLABORATEURS.....	42
12.2	ÉQUIPE DE MATLASHEWSKI ET CHAREST	42
13	L'APPROCHE PROTÉOMIQUE	43
	PROJET DE MAÎTRISE	46
	MATÉRIELS ET MÉTHODES	47
	RÉSULTATS	57
	DISCUSSION	82
14	DIFFÉRENCIATION DE <i>LEISHMANIA DONOVANI IN VITRO</i>	82
15	PROTÉINES A2	82
16	ESSAIS DE SURVIE DANS LES MACROPHAGES	83
17	ANALYSE PROTÉOMIQUE DE <i>L. DONOVANI</i>	84
17.1	AVANTAGES DE L'APPROCHE UTILISÉE.....	84
17.2	LIMITES DE L'APPROCHE UTILISÉE	86
17.3	VALIDATION DE L'APPROCHE PROTÉOMIQUE	87
17.3.1	<i>β-tubuline</i>	87
17.3.2	<i>Protéines identifiées</i>	88
18	ANALYSE DE QUELQUES PROTÉINES IDENTIFIÉES	90
18.1	HSP10.....	90
18.2	GLUTATHIONE PEROXIDASE	94
18.3	SAMS.....	95
18.4	EF-2	99
18.5	GAPDH	100
18.6	PROTÉINES INCONNUES	101
19	PERSPECTIVES	101
	BIBLIOGRAPHIE	106
	REMERCIEMENTS	xv

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Femelle de <i>Phlebotomus Papatasi</i> prélevant son repas sanguin.	5
Figure 2. Différenciation de <i>Leishmania</i> .	8
Figure 3. Manifestations cliniques des différents types de leishmanioses.	12
Figure 4. Distribution géographique de la leishmaniose.	14
Figure 5. Organisation structurale des leishmanies.	20
Figure 6. Mécanismes de survie élaborés par divers microorganismes pour survivre à l'intérieur des macrophages.	26
Figure 7. Structure de quelques glycoconjugués présents chez <i>Leishmania</i> .	34
Figure 8. Schéma illustrant les techniques de la différenciation <i>in vitro</i> de <i>L. donovani</i> , immunomarquage en fluorescence de l'alpha-tubulin des leishmanies pendant leur différenciation de promastigote en amastigote et immunobuvardage avec des anticorps monoclonaux contre les protéines A2.	62
Figure 9. Test de survie des <i>L. donovani</i> (LV9) dans les macrophages J774.	65
Figure 10. Analyse protéomique des extraits protéiques des promastigotes et des amastigotes de <i>L. donovani</i> sur bande de gel de pH 3-10.	67
Figure 11. Analyse protéomique des extraits protéiques des promastigotes et des amastigotes de <i>L. donovani</i> sur bande de gel de pH 4-7.	69

- Figure 12. Analyse en gel 2D de la régulation de la β -tubuline pendant la différenciation in vitro de *L. donovani* de promastigote en amastigote. 71
- Figure 13. Identification des protéines exprimées différemment entre le stade promastigote (haut) et amastigote (bas) de *L. donovani* sur gels 2D effectués avec bande de gel de pH 3-10. 73
- Figure 14. Identification des protéines exprimées différemment entre le stade promastigote (haut) et amastigote (bas) de *L. donovani* sur gels 2D effectués avec bande de gel de pH 4-7. 75
- Figure 15. Identification des protéines exprimées différemment entre le stade promastigote et amastigote de *L. donovani* sur gels 2D effectués avec bande de gel de pH 4-7, mais non identifiées à la figure 14. 77
- Figure 16. Alignement de séquence de la chaperone Hsp10 d'*Helicobacter pylori* avec le peptide de Hsp10 de *L. donovani*. 78
- Figure 17. Alignement de séquence de la glutathione peroxydase de *Leishmania major* avec les peptides de la glutathione peroxydase de *L. donovani*. 79
- Figure 18. Réaction simplifiée du cycle de repliement des protéines assisté par les chaperones GroEL-ES (HSP60-10). 93
- Figure 19. Métabolisme du trypanothione. 98

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1. Position systématique et classification du genre *Leishmania*. 3
- Tableau 2. Distribution des différents vecteurs de *Leishmania donovani*. 5
- Tableau 3. Distribution géographique et manifestations cliniques causées 13
par différentes espèces de *Leishmania*.
- Tableau 4. Réactions chimiques de la glutathione peroxidase, la catalase 36
et de la superoxide dismutase impliquant différents oxygènes réactifs.
- Tableau 5. Caractéristiques sommaires des protéines exprimées
différentiellement entre les promastigotes et les amastigotes et identifiées 80
par spectrométrie de masse.

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

A :	Alanine
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique codant
APS :	Amonium Persulfate
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ATP:	Adénosine triphosphate
BSA:	Albumine sérique bovine (<i>Bovine serum albumin</i>)
C :	Cystéine
CCA:	Acide α -cyano-4-hydroxy-trans-cinnamic
CHAPS :	(3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)- 1propanesulfonate)
CD-M6PR	Récepteur à mannose-6 phosphate cation-dépendant (<i>Cation-dependant mannose 6-phosphate receptor</i>)
CI-M6PR:	Récepteur du mannose-6 phosphate cation-indépendant (<i>Cation-independant mannose 6-phosphate receptor</i>)
CMHII :	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2
CR1:	Récepteur du complément 1(<i>Complement receptor C1</i>)
CR3:	Récepteur du complément 3 (<i>Complement receptor C3</i>)
CO ₂ :	Dioxyde de carbone
D :	Aspartate

DMEM:	Milieu eagle modifié de Dubelcco (<i>Dubelcco modified eagle medium</i>)
DTE :	Dithioerythritol
DTT :	<small>D</small> L-Dithiotheitol
E :	Glutamate
EEA1:	Autoantigène de l'endosome précoce (<i>Early endosome autoantigen 1</i>)
EF-2;	Facteur d'élongation 2 (elongation factor 2)
F :	Phényl-alanine
G :	Glycine
Gal:	Galactose
GAPDH :	Glycéraldéhyde phosphate déhydrogénase
GP :	Glutathione peroxidase
H :	Histidine
HIV :	Syndrome d'immunodéficience humaine
Hsp :	protéine de choc thermique
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HEPES :	(N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid))
I :	Isoleucine
IEF :	Focus isoélectrique (isoelectric focusing)
Ig:	Immunoglobuline
IL-1:	Interleukine-1

K :	Lysine
K ₂ CO ₃ :	carbonate de potassium
L :	Leucine
LAMP:	Protéine membranaire associée au lysosome (<i>Lysosomal associated membrane protein</i>)
LPG:	Lipophosphoglycan
LV :	Leishmaniose viscérale
M :	Méthionine
MALDI-TOF :	Matrix assist laser deionized time of flight
Man:	Mannose
MeOH :	méthanol
MES :	(2-(N-Morpholino)ethane sulfonic acid) Monohydrate
M6PR:	Récepteur du mannose-6 phosphate (<i>Mannose 6-phosphate receptor</i>)
N :	Asparagine
NEM:	N-éthyl maléimide
NH ₄ HCO ₃ :	Amonium hydrogenocarbonate
NO :	Oxide nitrique
NOs :	Oxide nitrique synthétase
NSF:	Facteur sensible au N-éthyl maléïmide (<i>N-ethyl maleimide sensitive factor</i>)
O ₂ :	oxygène

OH :	Radical hydroxyl
P :	Proline
PBS:	Solution saline tamponnée au phosphate (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PKC:	Protéine kinase C
PKDL:	Leishmaniose dermale post-kala-azar
PL:	Phagolysosome
PMN:	Polymorphonucléaire
Q :	Glutamine
Q-Tof:	Quadruple time of flight
R :	Arginine
rpm:	Révolution par minute
RLU:	Unité de lumière relative (<i>Relative light unit</i>)
S :	Sérine
SAM:	S-adenosylmethionine
SAMs:	S-adenosylmethionine synthetase
SDS-PAGE:	Sodium dodécylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SNAP:	Protéine soluble d'attachement au NSF (<i>Soluble NSF attachment protein</i>)
SNARE:	Récepteur du SNAP (<i>SNAP receptor</i>)
SVF:	Sérum de veau foetal

T :	Thréonine
TRIS :	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TFR:	Récepteur de la transferrine (<i>Transferrin receptor</i>)
TNF:	Facteur de nécrose tumorale (<i>Tumor necrosis factor</i>)
V :	Valine
W :	Tryptophane
WT:	Type sauvage (<i>Wild type</i>)
Y :	Tyrosine

INTRODUCTION

1 Phylogénèse

Les *Leishmania spp.* sont des protozoaires, parasites intracellulaires, appartenant à l'ordre des Kinetoplastida et à la famille des Trypanosomatidae (tableau 1). Le genre *Leishmania* comprend des espèces de parasites qui infectent les mammifères (Shaw, 1994) et d'autres qui infectent les reptiles (Telford, 1995). Les espèces infectant les mammifères sont divisées en deux sous-genres : *L. (Viannia)* est restreint au Nouveau Monde et *L. Leishmania* est trouvé autant dans le Nouveau que dans l'Ancien Monde (Lainson *et al.*, 1987). Les Kinetoplastida sont des protozoaires flagellés trouvés tant dans le milieu aquatique que terrestre, infectant des organismes très diversifiés tels que des plantes (genre *Phytomonas*) et des mammifères. Les Kinetoplastida ont évolué d'un ancêtre flagellé libre. La mouche des sables, ou son ancêtre qui existe probablement depuis l'ère jurassique (ère des reptiles), serait l'hôte primitif des leishmanies. Pendant l'évolution des mouches des sables primitives en mouches hémophages, les pressions sélectives auraient faites en sorte que les leishmanies sont devenues aptes à survivre dans les mammifères. Des parasites ancestraux des reptiles similaires au genre *Sauroleishmania* se seraient établis. Au même moment, les premiers petits mammifères ont fait leur apparition et seraient devenus les hôtes des mouches des sables hémophages. Les organismes aptes à survivre dans les vertébrés auraient donné naissance aux genres *Leishmania* et *Trypanosoma*.

Cependant, comme on retrouve les trypanosomes dans divers groupes tels que les poissons, les reptiles, les amphibiens, les oiseaux et les mammifères, cela suggère une évolution plus tôt ou une dispersion plus rapide que les leishmanies. En fait, il n'y a pas de vrais représentants du genre *Leishmania* dans les animaux à sang froid.

RÈGNE	Protista Heackel, 1866
SOUS-RÈGNE	Protozoa Goldfuss, 1817 emend. Siebold, 1848
EMBRANCHEMENT	Sarcomastigophora Honigberg et Balamuth, 1963
SOUS-EMBRANCHEMENT	Mastigophora Diesing, 1866
CLASSE	Zoomastigophora Calkins, 1909
ORDRE	Kinetoplastida Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976
SOUS-ORDRE	Trypanosomatina Kent, 1880
FAMILLE	Trypanosomatidae Doflein, 1901 emend. Grobben, 1905

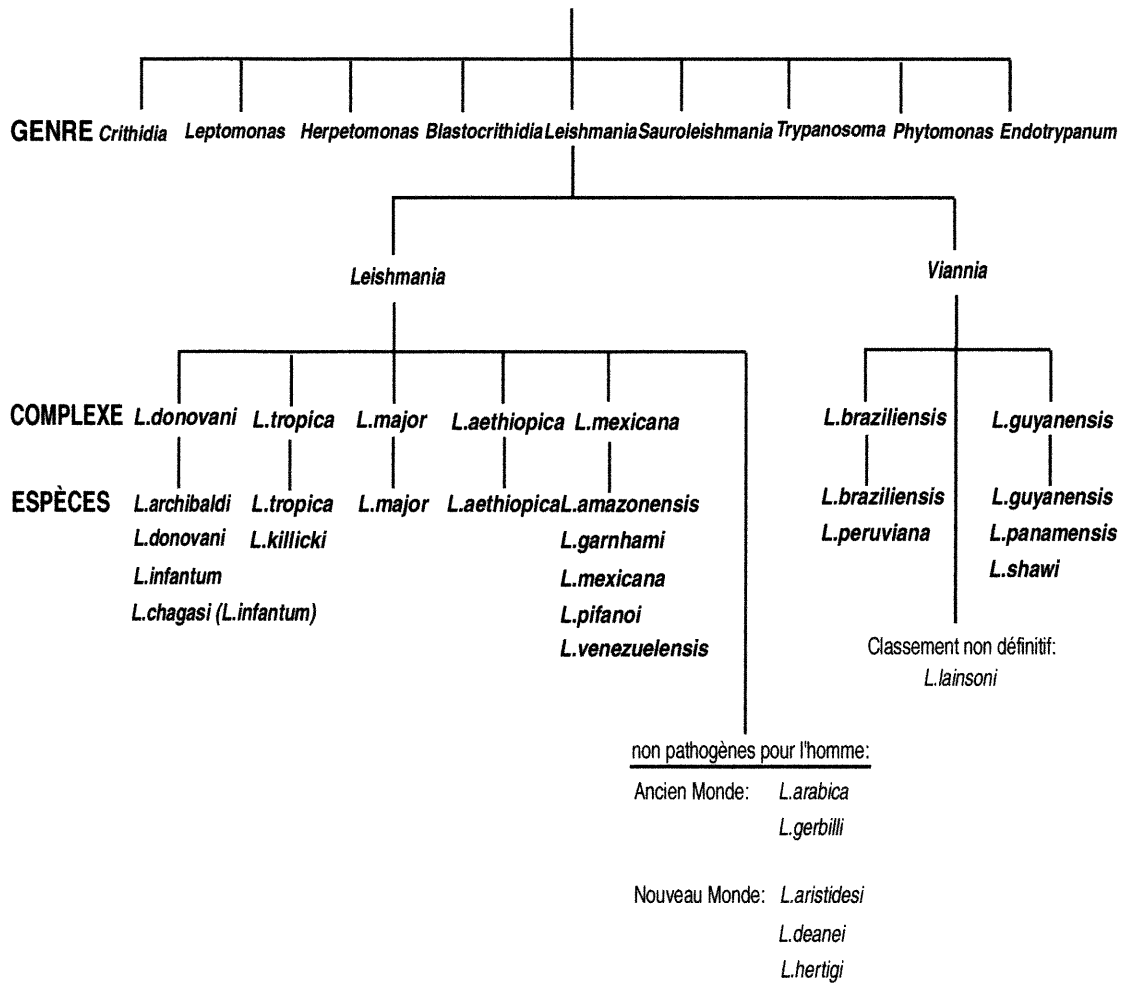


Tableau 1: Position systématique et classification du genre *Leishmania*
(classification de Lainson & Shaw, 1987 d'après Courret N. thèse d'après O.M.S., 1990)

2 Le vecteur

Toutes les espèces de *Leishmania* sont transmises par un insecte vecteur, la mouche des sables (figure 1), du genre *Phlebotomus* dans l'Ancien Monde ou *Lutzomia* dans le Nouveau Monde. Les *Phlebotomes* appartiennent à l'ordre des Diptera et à la famille des Psychodidae. Seules les femelles sont responsables de la transmission des leishmnanies. En fait, le sang prélevé lors de la piqûre est essentiel à la maturation des œufs. Les vecteurs impliqués dans le transport et la transmission de *L. donovani* à l'hôte mammifère sont *P. chinensis* (Chine), *P. martini* (Kenya), *P. orientalis* (Soudan) et *P. argentipes* (Inde) (tableau 2).



Figure 1. Femelle de *Phlebotomus papatasi* prélevant son repas sanguin (Rondanelli et Scaglia, 1993)

ESPÈCES	VECTEURS	AIRE GÉOGRAPHIQUE
<i>L. donovani</i>	<i>Phlebotomus chinensis</i>	Chine
	<i>Phlebotomus martini</i>	Kenya
	<i>Phlebotomus orientalis</i>	Sudan
	<i>Phlebotomus argentipes</i>	Inde

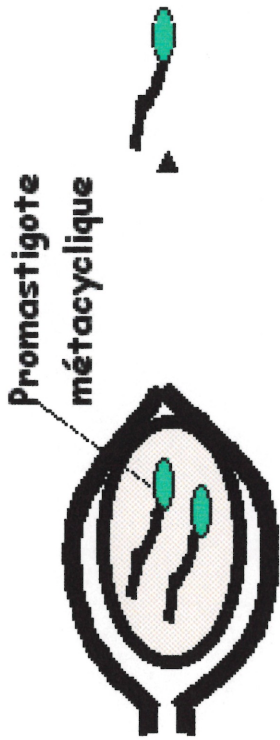
Tableau 2. Distribution géographique des différents vecteurs de *Leishmania donovani*.

3 Cycle de différenciation du genre *Leishmania* de promastigote en amastigote

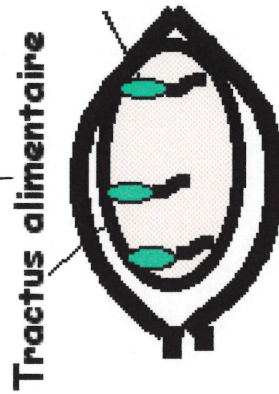
Tous les parasites appartenant au genre *Leishmania* sont biphasiques. Les deux stades distincts sous lesquels *Leishmania* est retrouvé sont caractérisés par un environnement, une morphologie ainsi que des caractères biochimiques propres à chacun (figure 2). Dans un des stades, le promastigote flagellé habite le tractus alimentaire (extracellulaire) de l'insecte vecteur, la mouche des sables femelle. Le promastigote, alors procyclique, est avirulent et se multiplie activement. La virulence est acquise lors de la métacyclogénèse, processus par lequel les promastigotes procycliques cessent de se diviser, se détachent des cellules épithéliales et migrent vers les parties buccales de l'insecte. Ainsi, lors du repas de la mouche, la piqûre administrée à son hôte mammifère vertébré permet l'inoculation des promastigotes métacycliques infectieux présents dans la bouche de la mouche, à l'intérieur des tissus de l'hôte (Sacks et Perkins, 1984, Sacks *et al.*, 1985; Pimenta *et al.*, 1992; Sacks *et al.*, 1995). Les parasites inoculés dans le derme de l'hôte mammifère sont alors rapidement phagocytés par les macrophages. Par phagocytose, les promastigotes se retrouvent dans des vacuoles parasitaires du macrophage, où ils sont soumis à des changements environnementaux majeurs, dont l'augmentation de la température (33-37°C) et la diminution du pH autour de 5 (Antoine *et al.*, 1990). Des changements majeurs dans l'expression de gènes ont alors lieu (Pan et McMahon-Pratt, 1988), et il y a différenciation en amastigotes, intracellulaires obligatoires,

ronds et immobiles. Il est important de noter que la nature des changements environnementaux qui induisent la différenciation ainsi que les processus biochimiques responsables de la différenciation de promastigotes en amastigotes sont encore largement inconnus. Finalement, plusieurs cycles de multiplication des amastigotes provoquent l'éclatement des macrophages infectés, libérant les leishmanies capables de propager l'infection en envahissant les macrophages sains avoisinants.

MOUCHE DES SABLES (PHLEBOTOMUS)



Arrêt de division, virulence, relâche des promastigotes métacycliques, migration vers les parties buccales



Promastigotes attachés aux cellules épithéliales, division active et non virulence

MACROPHAGE DE VERTÉBRÉS

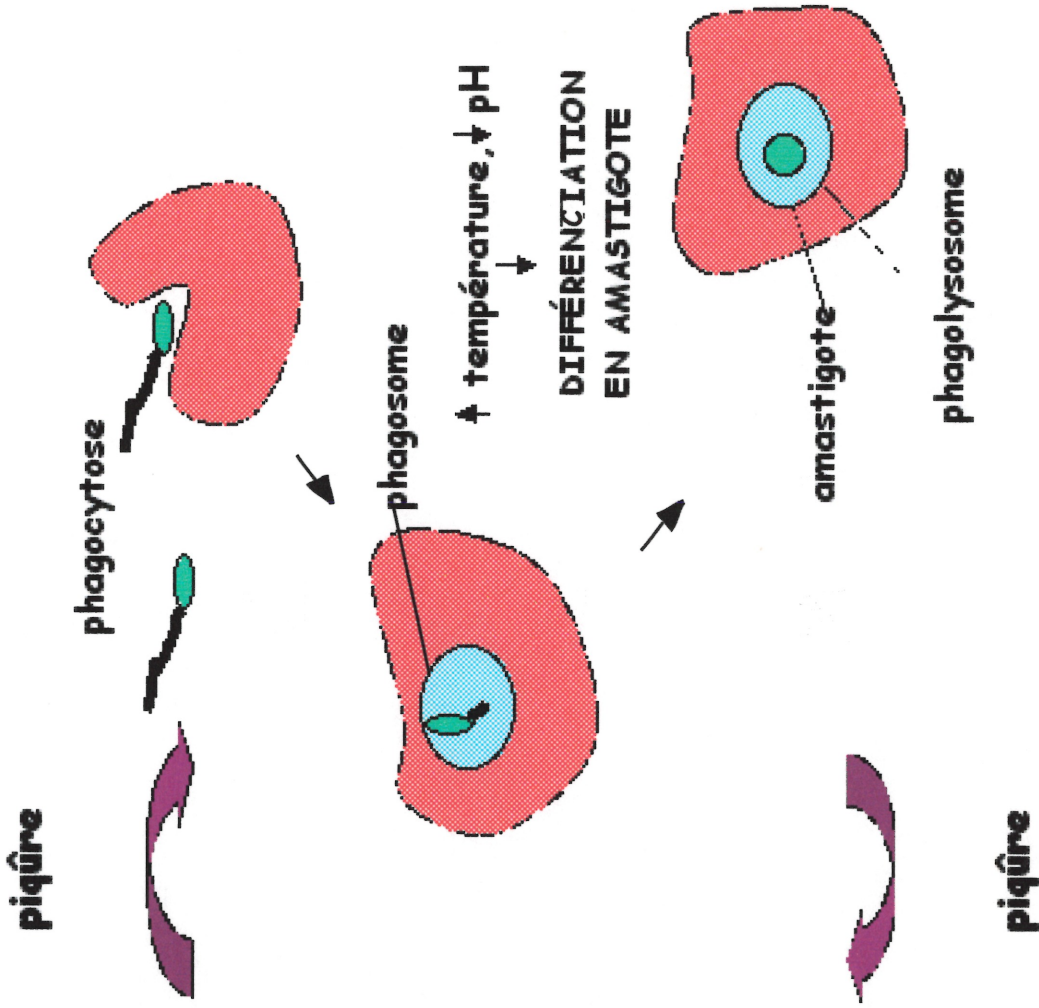


Figure 2. Cycle de différenciation de *Leishmania*.

4 Manifestations cliniques des leishmanioses

Les parasites appartenant au genre *Leishmania* sont responsables de la leishmaniose, maladie affligeant des millions de personnes à différents endroits à travers le monde (figure 3). Dépendamment de l'espèce en cause, la maladie présente différents symptômes cliniques; cutanées, mucocutanées ou viscérales (tableau 3).

4.1 Leishmaniose cutanée

La leishmaniose cutanée (figure 4.a) se manifeste par l'apparition de papules pouvant atteindre plus de 2 cm de diamètre, après une période d'incubation qui est généralement de quelques mois à quelques années. Les lésions se manifestent principalement au visage, aux bras et aux jambes. La plupart des lésions guérissent spontanément, mais des cicatrices importantes demeurent. Dans les cas où il n'y a pas de réponse immunitaire élaborée, il peut y avoir prolifération et alors formation de plusieurs lésions, caractérisant la leishmaniose de type cutanée diffuse. Cependant, cela ne résulterait pas seulement d'une déficience du système immunitaire, mais aussi de caractéristiques propres au parasite puisque cette affection est principalement vue dans les infections causées par *L. aethiopica* et *L. major pifanoi*.

4.2 Leishmaniose mucocutanée

La leishmaniose mucocutanée (figure 4.b) est caractérisée par la présence simultanée d'une lésion cutanée et d'une lésion muqueuse active dans la région du visage. Les principales muqueuses atteintes sont le pharynx, la palais, le larynx et la lèvre supérieure. Les ulcérations peuvent entraîner la destruction des muqueuses, par exemple la perforation de la cloison nasale et les lésions qui en résultent peuvent s'avérer défigurantes.

4.3 Leishmaniose viscérale

La leishmaniose de type viscéral (LV) est nommée Kala azar, ce qui signifie fièvre noire en Inde. Elle est causée par plusieurs espèces (tableau 3) dont *Leishmania donovani*, étudiée au laboratoire. Elle peut affliger tous les groupes d'âge et affecte principalement le foie, la rate et la moelle osseuse. La période d'incubation entre la piqûre de mouche et le premier symptôme de Kala azar est habituellement entre 2 et 6 mois (Napier, 1946; Manson-Bahr et al, 1963; Maegraith, 1980). Cependant, cette période peut être aussi variable que de 10 jours (Manson Bahr, 1966) à 9 ans (Wright, 1959; Manson Bahr, 1966). Les parasites se disséminent à travers tout le système réticulo-endothélial, causant l'hyperplasie des cellules phagocytaires du foie et de la rate (figure 4.c). Des fièvres, de l'anémie et un déséquilibre important des protéines du sérum sont ainsi engendrés et la fatalité s'ensuit si la maladie n'est pas traitée. La leishmaniose de type viscérale est souvent associée à la famine, à la pauvreté, à la guerre et à l'immunosuppression. Ces constats

sont basés sur le fait que la malnutrition, le stress et une déficience dans la réponse immunitaire sont des facteurs qui agissent en faveur du développement de la LV (Hommel, 1999). Des complications tardives de la maladie peuvent apparaître après le traitement de Kala azar ou même s'il n'y a eu aucune manifestation précédente de la maladie. C'est la leishmaniose dermale post-kala-azar (PKDL). Apparaissant généralement entre 1 et 5 ans après la cure pour traiter le Kala azar, différentes lésions de la peau peuvent survenir, notamment des macules hyper ou hypo pigmentées et la présence de nodules ressemblant à ceux causés par la lèpre (figure 4. d).

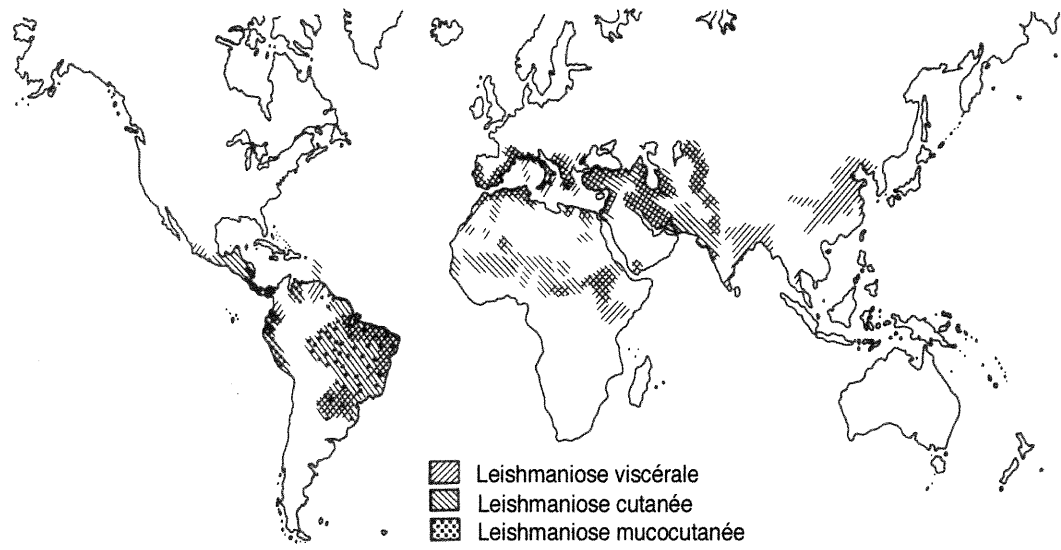


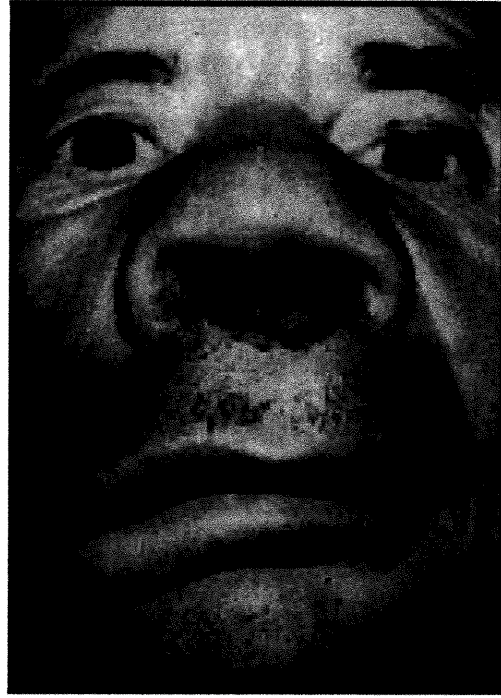
Figure 3. Distribution géographique de la leishmaniose

Complexe	Espèces	Distribution	Leishmanioses	Tendance à se résorber
<i>L. donovani</i>	<i>L. d. donovani</i>	Inde, Pakistan Nepal, Afrique	Viscérale	Non
	<i>L. d. infantum</i>	Asie Central, Chine Littoral Méditerranéen	Viscérale/cutanée	Non
	<i>L. d. chagasi</i>	Amérique du Sud et Centre	Viscérale	Non
<i>L. tropica</i>	<i>L. t. tropica</i>	Littoral Méditerranéen, Sud-ouest asie	Cutanée	Lentement/Non
<i>L. major</i>	<i>L. m. major</i>	Centre est, sud-ouest Asie Afrique subsaharienne	Cutanée	Rapidement
<i>L. aethiopia</i>	<i>L. a. aethiopia</i>	Ethiopie, Kenya	Cutanée/diffuse	Variable/Non
<i>L. braziliensis</i>	<i>L. b. braziliensis</i>	Brésil, Pérou, Equateur Bolivie, Paraguay, Vénézuéla, Colombie	Mucocutanée/cutanée	Non/Oui
	<i>L. b. peruviana</i>	Pérou, Argentine	Cutanée	La plupart
<i>L. guyanensis</i>	<i>L. g. guyanensis</i>	Guinée, Surinam, Brésil	Cutanée	Oui
	<i>L. g. panamensis</i>	Panama, Costa Rica, Colombie	Mucocutanée/cutanée	Non/Oui
<i>L. mexicana</i>	<i>L. m. mexicana</i>	Mexico, Guatemala, Belize	Cutanée	Variable
	<i>L. m. amazonensis</i>	Bassin Amazonien du Brésil	Cutanée/diffuse	Variable/Non
	<i>L. m. pifanoi</i>	Vénézuéla	Cutanée/diffuse	Variable/Non

Tableau 3. Distribution géographique et manifestations cliniques causées par différentes espèces de *Leishmania*.



a



b



c



d

Figure 4. Manifestations cliniques des différents types de leishmanioses.

- a) Pustules présents en plusieurs endroits sur le corps d'un homme atteint de leishmaniose cutanée diffuse. b) Défiguration chez un homme due à la leishmaniose mucocutanée. c) Jeune fille du Kenya âgée de 5 ans atteinte de la leishmaniose viscérale, kala-azar. On note la splénomégalie de la rate, du foie et la maigreur des bras. (Rees et Kager, 1987). d) Nodules présents chez un homme Indien atteint de leishmaniose dermale post-kala-azar.

5 Historique et épidémiologie de la leishmaniose viscérale

5.1 Historique

Bien qu'elle soit connue des médecins indiens depuis l'antiquité, c'est Leishman qui fut le premier, en 1900, à isoler le parasite de la rate d'un soldat des Indes décédé en Angleterre. Il publie sa découverte 3 ans plus tard, année où Donovan isole le parasite, cette fois chez un enfant, et en donne la description. Ross lui donnera le nom définitif de *Leishmania donovani* (Nozais *et al.*, 1999).

5.2 Épidémiologie

Il a été estimé que des 1,5 millions de nouveaux cas de leishmanioses à chaque année, 500 000 sont de type viscérale et parmi les 12-13 millions de cas de leishmanioses viscérales déclarées à travers le monde, 90% sont répartis en trois régions : Soudan/Ethiopie/Kenya; Inde/Bangladesh/Népal et Brésil (WHO. Information on the epidemiology and control of the Leishmaniasis by country to territory. P. Desjeux. WHO/LEISH/91.30.Geneva : World Health Organization. 1991; Who. Manual on visceral leishmaniasis control. WHO/LEISH/96.40.Geneva :World Health Organization.1996; Davidson, 1999) avec 100 000 décès associés à chaque année (Ashford, 1992).

6 Traitements de la leishmaniose viscérale

Jusqu'à présent, la chimiothérapie demeure le principal moyen de contrôle de la LV, puisqu'aucun vaccin efficace n'a été développé. En fait, le pentavalent antimonial (SB^v), le sodium stibogluconate (penostam) et le meglume antimonate (Glucantime) sont les principaux agents thérapeutiques utilisés puisque ces drogues sont les seules abordables dans les pays pauvres. Le répertoire suranné des drogues utilisées pour traiter les différentes leishmanioses ont plusieurs désavantages. En plus du manque d'informations sur leur mode d'action (Berman, 1985), leur taux de succès est variable et particulièrement faible chez les individus immunosupprimés (particulièrement les patients qui ont acquis le syndrome d'immunodéficience humaine (HIV) (Rizzi, 1988)). En plus, elles entraînent plusieurs effets secondaires, l'apparition de résistance, la possibilité de mutagenèse et le besoin de soins prolongés. *L. donovani* possède des caractères biochimiques propres qui lui confèrent ses propriétés infectieuses responsables de la maladie. Une meilleure connaissance du rôle de ces molécules, qui sont directement impliquées dans la maladie, est essentielle à la fabrication de nouvelles drogues ou à la mise au point d'un vaccin protecteur pour contrer leurs effets. Cependant, malgré le fait que la maladie soit majeure, les recherches pour de nouvelles drogues se font lentement notamment dû à un problème d'ordre économique. Puisque la maladie afflige principalement des pays économiquement défavorisés, les compagnies pharmaceutiques n'en font pas une priorité (Barrett *et al.*, 1999).

7 Séquençage génomique de *Leishmania major*

En 1994, la World Health Organisation a initié le projet de séquençage génomique de *Leishmania major* MHOM/IL/81/Friedlin (LMJF) qui a débuté en 1996. Des 36 chromosomes, les chromosomes 1, 3 et 4 sont terminés et le séquençage de plusieurs autres progresse (Myler, 2000). La majorité (70%) des gènes codants identifiés jusqu'à présent sont des gènes non classifiés. Certains codent pour des protéines homologues avec des protéines d'autres espèces, mais de fonction inconnue. Cependant, la plupart codent pour des protéines dont les motifs ne correspondent à aucun autre répertorié. On peut alors supposer que ces gènes ont des fonctions spécifiques pour le parasite. La séquence complète du génome devrait être disponible pour 2003 et l'on estime entre 4000 à 5000 (Myler, 2000) les gènes nouveaux qui seront identifiés et ayant des fonctions spécifiques pour les leishmanies. Ces gènes seront peut-être des cibles pour de nouvelles drogues ou des vaccins.

8 Organisation structurelle des leishmanies

Les leishmanies sont biphasiques et elles présentent une morphologie différente dépendamment du stade sous lequel elles se trouvent. Ainsi, le stade promastigote a une longueur de $2 \times 2-20 \mu\text{m}$, avec un flagelle du côté antérieur qui est aussi long que le corps. Le stade amastigote est plus court,

2-5 μm . Les amastigotes sont plutôt ronds et leur flagelle est extrêmement raccourci. Le flagelle est caractérisé par une structure en axonème classique avec 9 paires de microtubules disposées en anneau autour d'un doublet central de microtubules (figure 5). La membrane plasmique des leishmanies du côté antérieur est invaginée et forme un réservoir par lequel le flagelle émerge. Les activités d'endocytose et de sécrétion (de macromolécules) se font par l'intermédiaire de ce réservoir puisque ce sont les seules régions de cette structure cellulaire dépourvues de microtubules sous-jacents (Molyneux, 1975; Overath *et al.*, 1997). Sous la membrane plasmique, on note un réseau de microtubules attachés les uns aux autres et à la membrane plasmique qui forme le cytosquelette de la cellule et qui est responsable de la structure rigide de la cellule. Comme les leishmanies sont des cellules eucaryotes, elles possèdent les organites communs à la majorité de celles-ci: notamment le noyau, les réticulum endoplasmiques lisses et rugueux, l'appareil de Golgi, les endosomes et les lysosomes. Cependant, fait particulier, tous les Trypanosomatides ne contiennent qu'une seule mitochondrie par cellule. Celle-ci est caractérisée par un appendice, le kinétoplaste, qui est un organite unique présent chez tous les organismes appartenant à l'ordre des kinetoplastidae (d'où le nom), situé près du corps basal du flagelle. Il contient l'ADN mitochondrial arrangé en de nombreux maxi et mini cercles d'ADN (Simpson, 1987). Un autre organite unique, mais présent seulement chez la famille des Trypanosomatidae est le glycosome. Ainsi, la glycolyse chez les Trypanosomatidae diffère de la glycolyse chez les

autres eucaryotes puisque la majorité (90%) des enzymes glycolytiques se trouvent dans le glycosome (Opperdoes, 1987; Michels et Hannaert, 1994; Bakker, 1995). Les leishmanies sont des organismes diploïdes (ADN nucléaire et ADN kinétoplaste). Le génome nucléaire des leishmanies présents dans l'ancien monde contient 36 chromosomes (Winch *et al.*, 1996), tandis que ceux qui sont présents dans le nouveau monde, appartenant aux sous-genres *Leishmania*, en ont respectivement 34 (complexe *L. mexicain*) et 35 (complexe *L. braziliensis*) (Britto *et al.*, 1998). La multiplication des leishmanies se fait par division binaire. Jusqu'à présent, aucun des gènes codants étudiés ne contient d'introns. Cependant, la découverte d'épissage *cis* chez d'autres trypanosomatidae suggère que cela n'est peut-être pas le cas chez toutes les espèces de *Leishmania*. La majorité de ces gènes sont transcrits en un précurseur polycistronique d'ARNs. De plus, contrairement à la plupart des organismes procaryotes et eucaryotes pour qui la régulation de l'expression génique se fait principalement au niveau de la transcription, chez les parasites appartenant au genre *Leishmania*, la régulation génique est surtout post-transcriptionnelle (Vanhamme, 1995; Donelson *et al.*, 1999). Ainsi, la compréhension des mécanismes propres aux leishmanies fut limitée par les approches génomiques principalement utilisées jusqu'à présent. La protéomique semble s'avérer la technique de choix pour comprendre la régulation génique qui se produit lors de la différenciation du parasite en amastigote infectieux.

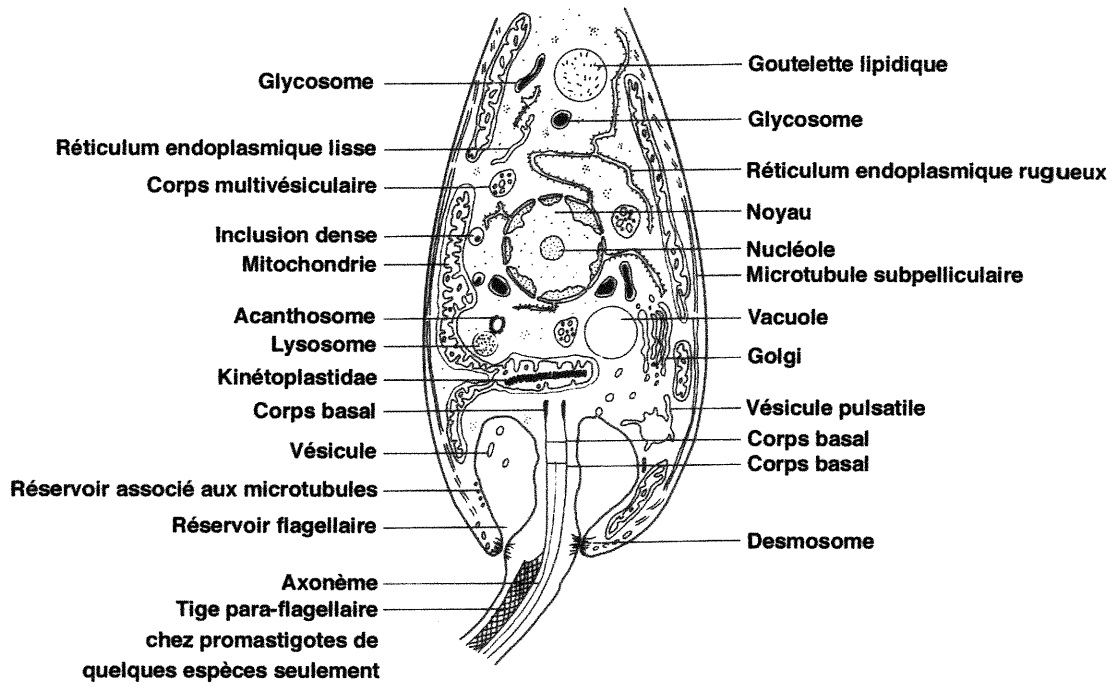


Figure 5. Organisation structurale des leishmanies (Chang et al., 1985)

9 Biogenèse des phagolysosomes et survie des microorganismes dans les macrophages

9.1 Phagocytose

Le terme phagocytose est employé pour désigner l'internalisation de grosses particules $>0,5 \mu\text{m}$ (Greenberg et Silverstein, 1993) destinées à être dégradées. Après l'interaction entre des molécules présentes à la surface de la particule à phagocyter et les récepteurs présents à la surface du phagocyte, ces particules, notamment les microbes, se retrouvent d'abord dans un phagosome (appelé vacuole parasitaire si la particule phagocytée est un parasite) dont la composition initiale est celle de la membrane plasmique (Muller *et al.*, 1980). Par un processus de maturation, les phagosomes acquièrent de nouvelles propriétés par la modulation de leur contenu en protéines (Desjardins *et al.*, 1994a; Garin *et al.*, 2001) menant à la formation de phagolysosomes aptes à dégrader les particules étrangères. En fait, il a été démontré que les modifications biochimiques et fonctionnelles sont causées par la fusion séquentielle des phagosomes avec les endosomes de différents âges, i.e. endosomes précoces, tardifs et lysosomes (Desjardins 1994a, 1994b, 1997). Ainsi, il y aurait perte de certaines protéines comme les récepteurs mannose et Fc et l'acquisition de marqueurs de plus en plus tardif i.e. des endosomes précoces aux endosomes tardifs. Il y aurait donc acquisition séquentielle de marqueurs précoces tels que Rab5 (Desjardins, 1994a) qui seraient à leur tour perdus avec le temps. Des

marqueurs des endosomes plus tardifs tels que Rab 7 sont alors acquis, notamment les molécules de la famille des LAMP, pompes à protons ATPase, récepteur mannose-6-phosphate, molécules du CMHII et plusieurs hydrolases membres de la famille des cathepsines (Pitt *et al.*, 1992; Jahraus *et al.*, 1994; Oh et Swanson, 1996; Claus *et al.*, 1998; Ramachandra *et al.*, 1999). L'hypothèse du « Kiss and Run » (Desjardins, 1994c) a été proposée pour expliquer les différentes interactions entre les phagosomes et les compartiments de la voie endocytaire. Il y aurait rencontre entre les phagosomes et les endosomes par leur mouvement le long des microtubules (Blocker *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 1999). Lors de la rencontre, il y aurait fusion des membranes de façon transitoire en des points focaux (Desjardins, 1994c) et formation d'un pore permettant alors l'échange de matériels, membranaire et luminal entre les phagosomes et endosomes, modifiant la composition biochimique des phagosomes. Par fission, il y aurait fermeture du pore et séparation des compartiments. La grosseur du pore serait régulée de façon à permettre le transfert de molécules de façon discriminante (Desjardins *et al.*, 1997). Les molécules Rab seraient possiblement les régulateurs de la fusion Kiss and Run (Duclos, 2000). C'est par la maturation des phagosomes en phagolysosomes, qui permet l'acquisition de nouvelles propriétés que ceux-ci deviennent des compartiments aptes à détruire les microbes.

9.1.1 Composition biochimique de la vacuole parasitaire contenant les leishmanies

Après la prise des promastigotes, ceux-ci se retrouvent dans le phagosome qui fusionne avec les compartiments de la voie endocyttaire de l'hôte, soit les endosomes précoces, tardifs, puis avec les lysosomes (Alexander et Vickerman 1975; Chang et Dwyer, 1976) qui ne contiennent qu'un ou 2 parasites accolés à la membrane (contrairement à *L. amazonensis* et *L. mexicana* qui sont dans de larges vacuoles contenant plusieurs leishmanies attachées à la membrane). De ces fusions résulte la vacuole parasitaire ou phagolysosome de composition très similaire aux endosomes tardifs. Le compartiment est acide, riche en peptides microbicides et en enzymes hydrolytiques (Antoine *et al.*, 1998), dont les cathepsines B, D, H, L et les glycoprotéines lysosomales membranaires LAMP 1 et 2. Les effets indésirables des enzymes et radicaux libres permettent habituellement de détruire les microbes. Cependant, les leishmanies ont élaboré des stratégies pour survivre à l'intérieur des macrophages (voir section 10).

9.1.2 Mécanismes élaborés par les microorganismes pour survivre à l'intérieur des macrophages

D'autres microbes ont élaboré des stratégies pour survivre à l'intérieur des macrophages (figure 6). Ainsi, les amastigotes de *Leishmania*, tout

comme la bactérie *Coxiella burnetti* qui est l'agent de la fièvre Q, résident dans des organelles similaires aux lysosomes. Quant à la survie de *C. burnetti*, elle serait assurée possiblement par l'élimination des métabolites oxygène (Li *et al.*, 1996).

D'autres, pour empêcher leur destruction par le phagolysosome, y échappent et fuient vers le cytoplasme où les conditions sont plus favorables. C'est le cas de *Listeria monocytogenes* responsable de la listériose, qui lyse la membrane phagolysosomiale par l'enzyme listeriolysine O (Gaillard *et al.*, 1991; Mengaud *et al.*, 1991). De la même façon, *Shigella spp*, par une activité lytique, lysent le phagosome et s'échappent dans le cytoplasme. D'autres modulent la biogenèse du phagolysosome. C'est le cas des promastigotes de *Leishmania* (expliqué plus loin) qui inhibent la fusion phagosome-endosome (Desjardins, 1997) pendant un court laps de temps afin de se différencier en amastigote. *Mycobacterium sp* quant à lui empêche la maturation complète du phagosome en phagolysosome en inhibant la fusion avec les lysosomes (Dermine *et al.*, 2000). *Salmonella sp* réside dans un compartiment dont les fusions avec les lysosomes sont très faibles (Buchmeier et Heffron, 1991). D'autres, comme *Toxoplasma gondii*, modulent la biogenèse du phagolysosome qui fusionne avec le réticulum endoplasmique où les conditions sont plus favorables puisqu'il n'est pas un organelle microbicide et qu'il est une source de nutriments (acides aminés) importante. Il y a donc plusieurs façons de contrer les effets lytiques du

phagolysosome, mais seules celles qui sont utilisées par *L. donovani* seront expliquées.

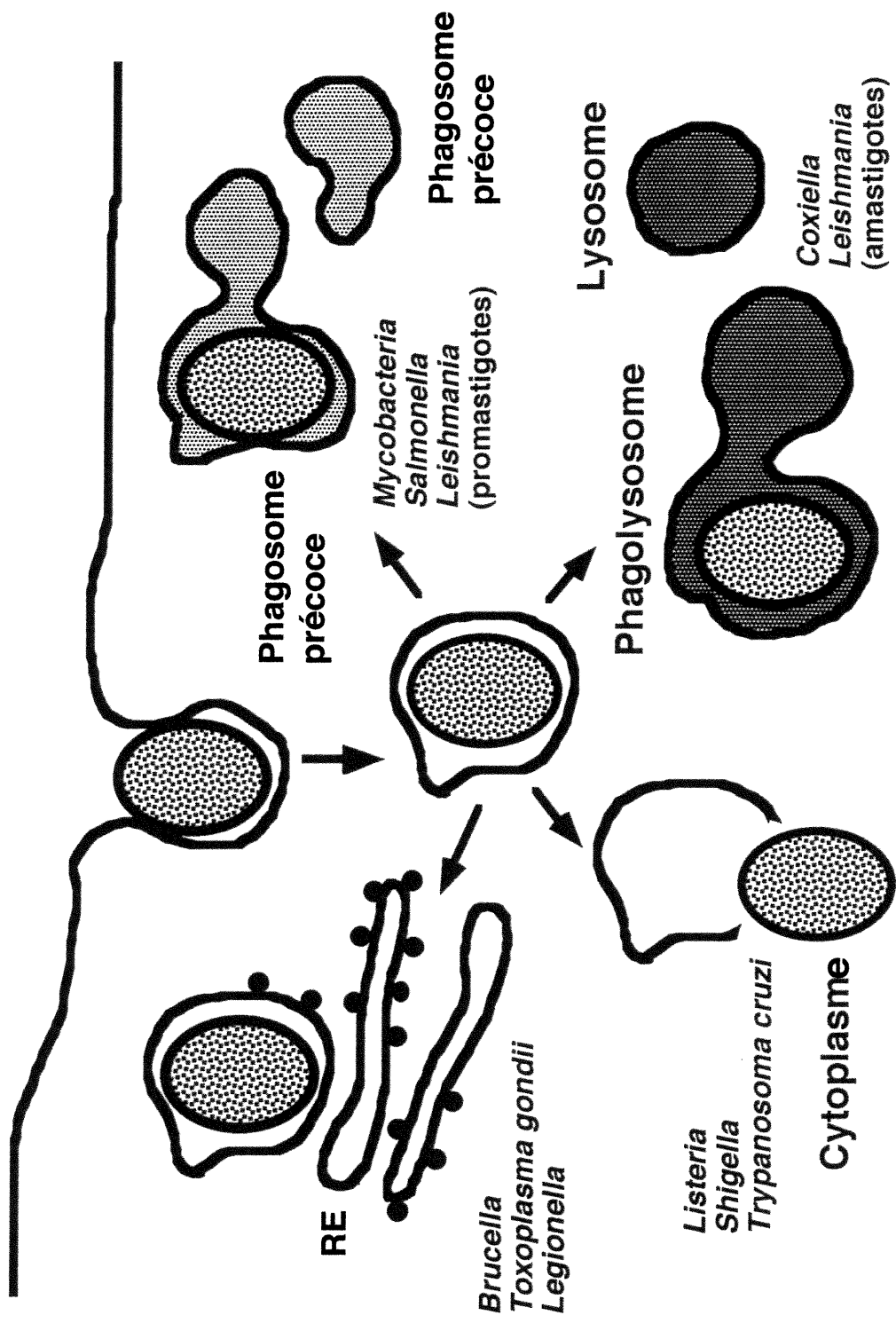


Figure 6. Mécanismes élaborés par divers microorganismes pour survivre à l'intérieur des macrophages (Dermine et Desjardins, 1999).

9.2 Composés oxygène toxiques

En plus des fonctions microbicides du phagolysosome, l'habileté qu'ont les phagocytes (monocytes, macrophages et polymorphonucléaires : neutrophiles, eosinophiles) à détruire les pathogènes dépend aussi de leur capacité à générer des composés oxygène toxiques. Ainsi, le superoxyde (O_2^-), le peroxide d'hydrogène (H_2O_2), les radicaux hydroxyles (OH), l'oxygène (O_2) et l'oxyde nitrique (NO) jouent un rôle majeur dans le contrôle des infections. L'oxygène consommé par les cellules, nécessaire à plusieurs réactions biochimiques du métabolisme aérobique, est ultimement réduit en eau par l'acceptation de quatre électrons. Cependant, une réduction partielle peut avoir lieu. L'addition d'un électron à la molécule d' O_2 donne le radical superoxyde O_2^- qui se réduit rapidement en H_2O_2 . La réduction de l'oxygène trivalent qui se passe par la réaction de H_2O_2 avec O_2^- produit le OH. Quant au NO, il est formé par un groupe d'enzymes, i.e. les enzymes synthétisant l'oxyde nitrique (NOs) (Moncada, 1993; Nathan et Xie, 1994). Ces enzymes oxydent la L-arginine en L-citrulline et en NO. Les NOs retrouvées dans les macrophages sont de type inductible, i.e. qu'elles sont activées par plusieurs cytokines, microorganismes et produits microbicides. Les différents composés induisent des torts importants aux cellules par différents moyens.

Les radicaux superoxydes ainsi que le H_2O_2 diffusent à travers la membrane. Par oxydation, la membrane et les enzymes sont alors endommagées, des mutations à l'ADN sont induites et le transport membranaire est inhibé (Weiss, 1986). Les radicaux hydroxyles oxydent

plusieurs molécules dont les protéines, l'ADN et les lipides suite à leur exposition initiale au O_2^- et/ou au H_2O_2 . Quant au NO, il entraîne des dommages aux enzymes du cycle respiratoire et interfère avec la synthèse d'ADN (Moncada et Higgs, 1993). De plus, les oxydants médieraient plusieurs des aspects de l'inflammation. Ils seraient responsables de l'activation de NF- κ B qui stimule la production de cytokines (ex. IL1 et TNF α) (Baeuerle et Henkel, 1994).

Ainsi, c'est par l'action jumelée des nombreuses enzymes hydrolytiques acquises par le phagolysosome et des composés toxiques émis par les macrophages que la destruction des microbes a habituellement lieu. Jusqu'à présent, quelques molécules qui sont essentielles à l'établissement et à la survie du parasite dans l'environnement hostile du phagolysosome ont été identifiées chez *L. donovani*. Certaines sont responsables de la modulation de la réponse microbicide initiée par le macrophage et d'autres, de l'inhibition des composés microbicides.

10 Principales molécules impliquées dans la virulence des leishmanies

10.1 Glycoconjugués

Les glycoconjugués de la membrane plasmique forment un glycocalyx entourant les leishmanies (figure 7). Ceux-ci jouent un rôle de première importance chez le parasite tout au long de son cycle, que ce soit dans la mouche ou dans son hôte mammifère où le parasite se retrouve successivement dans le sang, puis dans le phagolysosome. En fait, bien que le complément dans le sérum ait un rôle primordial et central dans la défense de l'hôte contre plusieurs microorganismes, le promastigote réussi à échapper aux effets lytiques du complément et à l'exploiter.

10.1.1 Lipophosphoglycan (LPG)

Le LPG est un glycoconjugué synthétisé abondamment par les promastigotes de toutes les espèces de leishmanies (McConville et Blackwell, 1991). Il consiste en quatre domaines: une charpente de phosphosaccharides attaché à la partie inositol d'une ancre lipidique, 1-O-alkyl-2-lyso-phosphatidyl(myo)inositol ancré dans la membrane et une longue chaîne d'unités disaccharidiques phosphorylées répétitives (PO₄-6Galβ1-4Man) (dont le nombre d'unités dépend du stade de croissance du

promastigote) qui se termine par une coiffe formée de quelques oligosaccharides neutres contenant du mannose ou du galactose (Turco et Descoteaux, 1992). Le LPG joue un rôle clé dans la survie du promastigote dans la mouche, lors de son inoculation dans les tissus de l'hôte et dans le macrophage. Dans la mouche, le LPG protège le promastigote contre l'activité hydrolytique qui y sévit. (Schlein *et al.*, 1990). De plus, c'est le LPG qui permet le détachement des promastigotes métacycliques de la paroi intestinale de la mouche pour se rendre à la hauteur de la bouche, permettant, lors de son repas, l'inoculation des parasites virulents à l'intérieur des tissus. C'est par l'élongation marquée de la molécule de LPG pendant la métacyclogenèse, due à l'augmentation du nombre d'unités disaccharidiques répétitives et la coiffe de sucres dont l'exposition est modifiée que le détachement des promastigotes métacycliques de la paroi intestinale est rendu possible. Lors de l'inoculation du parasite dans le derme du mammifère (Schlein, 1993), le promastigote est exposé aux effets lytiques du sérum, notamment le complément. Cependant, les études effectuées chez les promastigotes métacycliques de *L. donovani* ainsi que *L. major* démontrent qu'ils sont plus résistants, ce qui corrèle avec l'augmentation du nombre d'unités répétitives de disaccharides phosphorylés (Sacks, 1990; McConville et Blackwell, 1991; McConville *et al.*, 1992; Sacks, 1995; Saraiva *et al.*, 1995) et que ceux-ci inhibent la destruction par le complexe d'attaque membranaire en empêchant le recrutement du complexe C5-C9 du complément (Puentes *et al.*, 1990). En agissant comme un site de déposition

de la molécule C3b du complément (Puentes *et al.*, 1989), le LPG permet la fixation des promastigotes aux macrophages (Handman *et al.*, 1985) par liaison aux récepteurs CR1 et CR3 présents (Blackwell *et al.*, 1985; Wilson et Pearson, 1988). Il y a donc phagocytose par l'intermédiaire des récepteurs du complément, mais sans déclenchement d'une réponse microbicide, contrairement aux récepteurs Fc, dû à l'inefficacité des récepteurs CR1 et CR3 à déclencher une telle réponse (Wright et Silverstein, 1983; Yamamoto et Johnston, 1984; Greenberg et Silverstein, 1993; Brittingham et Mosser, 1996; Alexander *et al.*, 1999). Après la phagocytose, les leishmanies se retrouvent dans un compartiment appelé la vacuole parasitaire et le LPG présent à la surface du promastigote inhibe la fusion phagosome-endosome (Desjardins et Descoteaux, 1997), ce qui retarde la maturation du phagosome. Le promastigote aurait le temps d'initier sa différenciation en amastigote, forme apte à survivre à l'intérieur du phagolysosome avant la formation du phagolysosome (Scianimanico *et al.*, 1999). Comme l'amastigote est dépourvu de LPG, la biogenèse des phagolysosomes se poursuit ensuite, expliquant pourquoi le compartiment acquiert les propriétés des endosomes tardifs et ce, même si son processus est arrêté momentanément.

Le LPG est aussi impliqué dans la capture des radicaux libres libérés lors de la réponse microbicide, notamment le OH^\cdot et O_2^\cdot (Chan *et al.*, 1989). Le LPG module aussi les voies de signalisation chez le macrophage. En effet, il inhibe l'activité de la PKC (Giorgione *et al.*, 1996), qui initie la flambée respiratoire dans les phagocytes (Farago et Nishizuka, 1990; Houslay, 1991),

notamment l'expression de NOS2 et de NO (Proudfoot *et al.*, 1996). De plus, son inhibition interfère avec la production d'interleukine 1, cytokine importante dans les infections (Dinarello, 1994), l'augmentation de la phagocytose et l'activité microbicide (Mandell, 1995). Le LPG inhibe l'induction des ARNm IL-12. Ainsi, comme IL-12 est critique dans le développement des cellules TH1 (Trinchieri, 1995) qui sont responsables de la production d'INF γ qui active les macrophages à produire du NO, l'inhibition de IL-12 diminue indirectement la production de NO (Piedrafita, 1999). Chez les amastigotes, on retrouve les GIPL(s) qui sont des glycosyl-inositol phospho-lipides, liés à la membrane par groupement acyl-1-alkylphosphatidylinositol (McConville et Ferguson, 1993) et qui ressemblent au corps de phosphatidylinositol-phosphosaccharide du LPG (Proudfoot *et al.*, 1995). Ceux-ci, d'abord découvert chez *T. brucei* (Ferguson *et al.*, 1985), sont communs à toutes les cellules eucaryotes. Ils sont abondants et forment un manteau dense protégeant la membrane plasmique des amastigotes des enzymes vacuolaires (Ralton et McConville, 1998). De plus, ils inhibent la production de NO (Proudfoot *et al.*, 1995), ce qui contribue à la survie des leishmanies à l'intérieur de la vacuole parasitaire.

10.1.2 Leishmanolysine (GP63)

La GP63 est un autre glycoconjugué, une métalloprotéinase zinc dépendante (Bordier, 1987), important retrouvé à la surface des promastigotes. Étant surexprimé chez les promastigotes métacycliques, c'est un composant

majeur qui contribue à la résistance de ceux-ci face au complément. Tout comme le LPG, cette molécule inhibe la lyse médiée par le complément par clivage de la molécule C3b en une forme C3bi qui ne peut pas fixer le complexe d'attaque membranaire (Brittingham *et al.*, 1995). Chez les amastigotes, la GP63 semble plutôt concentrée dans la lumière de la poche flagellaire où elle dégraderait possiblement les macromolécules de l'hôte pour sa nutrition ou pour la protection des composants de la membrane de la poche flagellaire.

La transformation du parasite en amastigote est accompagnée de nombreux changements morphologiques et biochimiques. La forme amastigote est caractérisée par une diminution (Turco et Sacks, 1991), voire une inhibition presque complète de la GP63 (Medina-Acosta E. *et al.*, 1989). Il en résulte d'une part que les amastigotes doivent utiliser de nouvelles stratégies qui ne sont pas encore très connues pour entrer dans de nouvelles cellules hôtes (Mosser, 1994).

membrane plasmique
de *Leishmania*

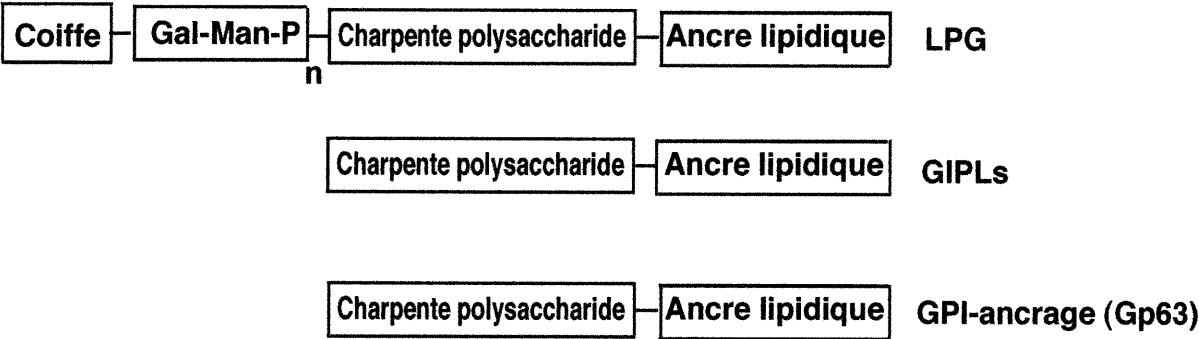


Figure 7. Structure de quelques glycoconjugués présents chez *Leishmania*.

10.2 Antioxydants

Tel que mentionné précédemment, l'activité leishmanicide est principalement due aux métabolites toxiques de l'oxygène : le superoxyde (O_2^-), l'oxygène (O_2), le radical hydroxyle (OH) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Murray, 1981; Pearson *et al.*, 1982). L'habileté qu'ont les promastigotes métacycliques et les amastigotes de *L. donovani* et *L. major* à avoir des taux de survie plus grands que les promastigotes procycliques est aussi attribuable en grande partie à la production de superoxyde dismutase, de catalase et glutathione peroxydase (tableau 4). En effet, la superoxyde dismutase entraîne l'élimination des O_2^- , la catalase converti le H_2O_2 en H_2O et en O_2 et la glutathione peroxydase capture les OH^- (Miller, 1997). Cela explique pourquoi les expériences de Murray (1982) démontrent que les amastigotes de *L. donovani* qui possèdent 3 fois plus de catalase et 14 fois plus de glutathione peroxidase sont, plus résistants (résumé dans Rajeev, 1996).

Réaction	Formule
Glutathione peroxidase	$2 \text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{G-S-S-G} + 2\text{H}_2\text{O}$
Catalase	$2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
Superoxide dismutase	$2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$

Tableau 4. Réactions chimiques de la glutathione peroxidase, la catalase et de la superoxide dismutase impliquant différents oxygènes réactifs.

10.3 Chaperones

Les changements drastiques auxquels sont soumises les leishmanies, vu le cycle perpétuel du parasite entre ses hôtes vertébrés et invertébrés, causent des remaniements majeurs dans son organisation cellulaire. La présence de protéines chaperones est alors essentielle dans le repliement, l'assemblage, le transport et la dégradation de protéines dans la cellule (Gething et Sambrook, 1992; Morimoto *et al.*, 1994; Hartl, 1996). Ces protéines sont ubiquitaires et très abondantes dans la cellule. Plusieurs sont des protéines de chocs thermiques, notamment les protéines de choc thermique (Hsp 60,70,83,100). La synthèse de protéines de chocs thermiques a été démontrée chez plusieurs espèces dont certaines appartenant à la famille des Trypanosomatidae (Van der Ploeg *et al.*, 1985).

Les Hsp 65,70 et 83 semblent jouer un rôle essentiel dans le processus de différenciation des parasites (Van der Ploeg *et al.*, 1985). En effet, parallèlement aux changements de température qui jouent un rôle central dans la différenciation des leishmanies de promastigote en amastigote et vice-versa, on note une variation dans l'expression de ces protéines. L'expression de ces Hsp(s) est augmentée lorsque le parasite est exposé aux températures de l'hôte, 37°C. Les Hsp semblent aussi jouer un rôle important dans la protection du parasite contre le NO, la principale molécule effectrice médiant la destruction des leishmanies. Les promastigotes virulents, exposés au NO montrent une augmentation dans la synthèse de Hsp 83,70 et 65. L'augmentation de l'expression des Hsp chez les promastigotes de *L.*

donovani en réponse à des doses subléthales de NO suggère que ces Hsp jouent un rôle protecteur pour la survie du parasite dans le mammifère (Adhuna *et al.*, 2000). Quant à Hsp 100, on note que sa concentration est augmentée de plusieurs fois suite au choc thermique. Son abondance chez les amastigotes, comparativement aux promastigotes, semble jouer un rôle important dans les stades initiaux de l'infection (Hubel, 1997). Une étude effectuée chez *L. major* démontre qu'elle est importante pour la différenciation du parasite et pour sa survie dans le mammifère (Krobitsch *et al.*, 1998). On note aussi la calréticuline qui est une chaperone impliquée dans le bon repliement des glycoprotéines et possiblement de protéines sécrétées comme la superoxyde dismutase (Zhang, 1997 et Michalak, 1999). L'observation de la surexpression de la calréticuline chez les amastigotes indique qu'elle répond elle aussi très vite aux changements environnementaux qui surviennent chez ces trypanosomatidae (Souza *et al.*, 1994).

10.4 Autres modulations du système immunitaire permettant la survie des leishmanies

À part les molécules nommées précédemment, d'autres encore inconnues doivent être impliquées dans la modulation génique de l'hôte, en ce sens que d'autres effets sur la réponse immunitaire sont également observés. Lors de la piqûre par la mouche des sables femelle dans les tissus de l'hôte, il y a inoculation de salive. Celle-ci contient des agents

anticoagulants et d'importants vasodilatateurs contribuant à la réponse inflammatoire (Ribeiro *et al.*, 1989). La salive favoriserait la survie du parasite et son établissement en ce sens qu'elle agit comme un facteur de virulence. En effet, elle inhibe la production d' H_2O_2 par le macrophage (Titus et Ribeiro, 1990), la production de NO (Hall et Titus, 1995) et accélère le développement de lésion (Lima et Titus, 1996).

Il semble qu'il y ait aussi inhibition de l'apoptose des macrophages par l'induction de $TNF\alpha$ et d'IL-6 (Moore et Matlashewski, 1994; Antoine *et al.*, 1998). Les amastigotes persisteraient par la survie prolongée des cellules.

Néanmoins, bien que les leishmanies altèrent plusieurs des processus microbicides initiés par les macrophages, certains demeurent. Le pH vacuolaire est maintenu et les hydrolases sont transférées normalement à la vacuole parasitaire (Handman, 1999). Plusieurs changements biochimiques qui permettent aux amastigotes d'être si bien adaptés à cet environnement hostile acide et abondant en hydrolases sont inconnus et restent à être élucidés. Il semble que les protéines membranaires des amastigotes soient plus résistantes à la protéolyse comparativement aux protéines membranaires des promastigotes. De même, le métabolisme des amastigotes serait adapté au pH acide. En fait, leurs pompes à protons fonctionnent de façon optimale à pH acide et permettent le maintien du pH intracellulaire près de la neutralité (Glaser *et al.*, 1988) et les amastigotes exploitent le gradient de protons à travers leur membrane (formé sous des conditions acides) pour leur transport actif de glucose et d'acides aminés.

11 Culture *in vitro*

Jusqu'à tout récemment, on possédait peu d'information sur la biochimie des amastigotes puisque peu d'études biologiques et biochimiques avaient été effectuées. D'une part, à cause des difficultés à obtenir des quantités suffisantes d'amastigotes viables libres de tout débris provenant de la cellule hôte. D'autre part, à cause des populations hétérogènes isolées de tissus infectés qui sont à différents stades du cycle cellulaire (Trager, 1983). Contrairement, les promastigotes facilement cultivables *in vitro* ont fait l'objet de plusieurs études. Les conditions de culture *in vitro* permettant la survie du parasite en ses deux stades distincts et permettant sa transformation de promastigote en amastigote et vice-versa commencent à être élucidées. En fait, il semble que les changements de température et de pH soient les deux principaux facteurs initiateurs du processus de différenciation chez les différentes espèces de *Leishmania* (Bates *et al.*, 1992; Joshi *et al.*, 1993; Bates 1993; Doyle *et al.*, 1991; Pan, 1984; Rainey *et al.*, 1991). Une combinaison de l'élévation de la température et de la diminution du pH faciliterait l'établissement d'une culture stable d'amastigotes axéniques. Par exemple, une combinaison de la température à 37°C et du pH 5,5 peut être utilisée pour établir une culture d'amastigotes axéniques de *L. donovani* viscérale. De même, les amastigotes de *L. mexicana* dérivés de lésions animales peuvent être propagés en conditions axéniques en les cultivant à pH 5,5 à 32°C (Bates, 1994). Sous ces conditions, les parasites manifestent non seulement la morphologie typique des amastigotes, mais aussi des

marqueurs de différenciation tels que le groupe de protéines A2 très surexprimé chez les amastigotes de *L. donovani* cultivés *in vitro* ou isolés de lésions animales.

La culture d'amastigotes axéniques a l'avantage de pouvoir être utilisée en tant que modèle *in vitro* pour étudier le développement qui se produit *in vivo*. De plus, l'habileté à contrôler précisément les conditions de cultures extra-cellulaires facilite l'élucidation des processus de différenciation à court et long terme comme la synthèse de protéines induites en condition de stress. Bien que les formes promastigotes soient couramment gardées en cultures axéniques, les formes amastigotes sont néanmoins plus souvent maintenues dans les macrophages. La culture *in vitro* de *L. donovani* a ainsi permis à deux équipes d'identifier des transcrits spécifiques aux amastigotes de *L. donovani* par étude comparative entre promastigotes et amastigotes cultivés *in vitro*.

12 Expression génique et protéique différentielle entre promastigote et amastigote de *Leishmania donovani*

Avec les connaissances sur les méthodes de culture *in vitro*, deux équipes ont étudié l'expression génique et protéique différentielle des promastigotes et amastigotes axéniques.

12.1 Équipe de Joshi et collaborateurs

L'équipe de Joshi et collaborateurs (Joshi *et al.*, 1993) ont construit deux bibliothèques d'ADN complémentaire à partir d'ARN poly(A)+ isolé des promastigotes et des amastigotes. L'hybridation à l'ARN isolé de chacun des stades du parasite en Northern et slot-blots, leur a permis d'obtenir 3 clones exprimés différemment. Les ARN des clones A41 et A45 sont deux fois plus élevés chez les amastigotes que chez les promastigotes et à l'inverse, l'ARN du clone P17 est deux fois plus élevé chez les promastigotes. Ces trois gènes seraient uniques au genre *Leishmania*. Par comparaison des acides aminés, on note que le cadre de lecture ouvert de P17 a une similarité importante avec une protéine ribosomale de graine de soya S11. De plus, la protéine encodée par A45 est reconnue par le sérum des patients. Aucun suivi de cette étude n'a été réalisé.

12.2 Équipe de Matlashewski et Charest

De la même façon, l'équipe de Charest et Matlashewski (Charest et Matlashewski, 1994) ont identifié une famille multi-gène A2 très abondante chez les amastigotes et peu chez les promastigotes. Cette famille de gène code pour une famille de protéines. Ces protéines sont constituées d'une série d'acides aminés démontrant une certaine homologie avec l'antigène S de *Plasmodium falciparum* (souche V1). Tout comme A2, l'antigène S est spécifique au stade correspondant au parasite quand il est à l'intérieur de son hôte, un mammifère. Les protéines A2 sont requises pour la survie du

parasite à l'intérieur de son hôte. Il s'agit du seul facteur de virulence spécifique aux amastigotes identifié jusqu'à présent chez *Leishmania donovani* (Zhang et Matlashewski, 1997).

La compréhension des mécanismes sous-jacents la différenciation du parasite qui résulte de sa capacité à s'adapter à des environnements aussi distinct que la mouche et la phagosome est primordiale. C'est par l'élucidation de ces mécanismes que des drogues et thérapies efficaces pourront être établies. Bien sûr, l'identification de toutes les molécules exprimées par le parasite facilitera l'étude de ces mécanismes. Notre étude se base sur le fait que ce sont les protéines exprimées différemment par l'amastigote qui déterminent son aptitude à survivre dans l'environnement hostile qu'est le phagolysosome. Sachant que la régulation génique chez les espèces de *Leishmania* est plutôt post-transcriptionnelle (Donelson *et al.*, 1999), notre équipe, contrairement aux deux autres propose une approche protéomique pour arriver à ses fins.

13 L'approche protéomique

Pour la première fois utilisée en 1994 lors d'un congrès « Siena 2-D Electrophoresis », le terme « protéome » signifie toutes les protéines exprimées par le génome (Williams et Hochstrasser, 1997). Le protéome contrairement au génome n'est pas un caractère fixe. Il est modifié en fonction du stade de développement du tissu et des conditions environnementales auxquelles est soumis l'organisme. Par conséquent, il y a

plus de protéines dans le protéome que de gènes dans le génome, surtout pour les eucaryotes. Ceci s'explique par le fait qu'il y a plusieurs façons pour un gène d'être épissé pour former un ARN messenger. De même, une protéine donnée peut avoir plusieurs fonctions dépendamment des modifications post-traductionnelles encourues. Ainsi, la protéomique aidera à déterminer ces modifications post-traductionnelles (Gooley et Packer, 1997). L'approche protéomique est plus près de la réalité des événements qui ont cours dans les cellules eucaryotes. En effet, une étude récente a démontré qu'il n'y a pas nécessairement une bonne corrélation entre le taux d'ARNm et de protéines dans une cellule à un temps donné (Anderson et Seilhamer, 1997). Par exemple, les ARNm du foie humain sont enrichis en protéines sécrétées, alors que les ARNm traduits en protéines sont sous-représentés. Le séquençage de l'ADN et du criblage des ARNm ou des milliers de gènes peuvent être rapidement analysés, ont été développés pendant la dernière décennie. Par conséquent, la protéomique a été moins utilisée puisque les techniques de séparations protéiques disponibles étaient techniquement compliquées et que les résultats étaient difficilement reproductibles. Actuellement, beaucoup d'efforts sont déployés pour résoudre ces problèmes. La reproductibilité des patrons protéiques entre les gels s'est grandement améliorée par la mise au point des gradients immobilisés de pH (IPGs) utilisés pour la séparation des protéines selon leur point isoélectrique (première dimension). Les progrès effectués au niveau des équipements et des réactifs nous permettent maintenant de détecter sur un même gel plus de

5000 protéines. De plus, de nouveaux logiciels facilitent grandement l'analyse des patrons protéiques, dont les protéines peuvent maintenant être rapidement identifiées par la spectrométrie de masse.

Projet de maîtrise

Les différents résultats quant aux caractéristiques morphologiques, géniques et biochimiques des promastigotes et des amastigotes démontrent que ces deux stades sont très distincts. Cela suggère qu'une panoplie de gènes et par conséquent de protéines, est exprimée différenciellement entre les deux stades. Plusieurs modulations de la réponse microbicide sont initiées par les amastigotes, mais les mécanismes responsables de ces modulations sont encore largement inconnus. Les changements environnementaux auxquels est soumis le parasite sont responsables de changements dans le niveau d'expression de plusieurs protéines entraînant la différenciation du promastigote en amastigote. Nous supposons que des facteurs de virulence exprimés spécifiquement par l'amastigote sont responsables de leur survie dans l'environnement hostile des phagolysosomes et de l'induction de la leishmaniose de type viscéral.

Mon projet consiste donc à reproduire *in vitro* la différenciation des promastigotes en amastigotes pour déterminer les protéines surexprimées et exprimées spécifiquement chez les amastigotes de *L. donovani*. L'approche protéomique avec électrophorèse en deux dimensions et spectrométrie de masse nous permet d'identifier des protéines surexprimées et exprimées spécifiquement chez les amastigotes.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Culture cellulaire

Les cultures de promastigotes et d'amastigotes axéniques utilisées pour les différentes expérimentations proviennent initialement d'amastigotes de *Leishmania donovani* (Sudanese strain 1S) isolés du foie de hamsters infectés. La croissance des promastigotes est réalisée en cultivant ces amastigotes à 26°C dans le milieu M199 (Life Technologies) modifié tel que décrit précédemment (Descoteaux *et al.*, 1994), supplémenté avec 10 % de sérum de bovin foetal inactivé à la chaleur et tamponné avec 10mM d'HEPES à pH 7,4. La différenciation *in vitro* des promastigotes en amastigotes axéniques est réalisée comme suit; les promastigotes en phase stationnaire (4 jours) sont transférés dans le même milieu supplémenté avec 20% de sérum de fœtus bovin et incubé à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ pendant 16-24 heures. Ensuite, les cellules sont resuspendues dans du RPMI 1640 (Life Technologies) supplémenté avec 20 % de sérum de fœtus bovin titré à un pH de 5,5 avec 10 mM de MES, conditions mimant celles qui sont présentes à l'intérieur du phagolysosome du macrophage. Sous ces conditions, les promastigotes se différencient en amastigotes axéniques en 48-120 heures (Ephros *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 1997). Les amastigotes axéniques produits sont constamment redifférenciés en

promastigotes. Ils sont centrifugés (2500 g X 5 minutes), puis resuspendus dans le M199 modifié (milieu réservé aux promastigotes) et incubés à 26°C.

Les promastigotes de *Leishmania donovani* (souche Éthiopienne LV9, obtenue de Matlashewsi, Université McGill, Montréal, Canada) utilisés pour les tests de survie dans les macrophages sont transfectés avec le vecteur d'expression luciférase pGEM72f/anealuc (donné par Descoteaux A., INRS-Institut Armand Frappier, Montréal, Canada) sont cultivés à 26°C en présence de 50 µg/ml G418 dans le M199 modifié.

Les macrophages J774 de souris sont cultivés tel que décrit précédemment (Desjardins *et al.*, 1994a).

Immunofluorescence

Les promastigotes et amastigotes sont fixés dans une solution de 20% méthanol/80% acétone pour 20 minutes à -20°C. Suivant la fixation, les cellules sont lavées dans de la solution saline tamponnée au phosphate (PBS) deux fois 5 minutes, puis 10 minutes et bloquées dans du PBS contenant 2% de BSA (fraction V, Sigma, St-Louis, MO) et 0,2 % gélatine. L'incubation avec un anticorps contre l'alpha-tubuline (1/1000) a été fait 1 heure à la température de la pièce (Sigma). Après trois lavages dans du PBS, 1% BSA, les cellules sont incubées avec de l'anti-souris IgG (1/500) (Molecular Probes) conjugué à l'ALEXA pour 30 minutes à la température de

la pièce. Après trois lavages dans le PBS, 1% BSA et une fois dans le PBS, les lamelles sont montées sur des lames avec du polyvinyl alcohol (Gelvatol, Air Products & Chemicals, Allentown, PA) et observées avec un microscope Zeiss inversé à épifluorescence.

Immunobuvardage

Détection des protéines A2

Les protéines de 1×10^7 promastigotes et d'amastigotes axéniques de *L. donovani* ont été séparées sur un gel SDS-PAGE contenant 10 % d'acrylamide selon les techniques standard (Laemmli, 1970). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose et analysées par immunobuvardage pour détecter les protéines A2 avec l'anticorps monoclonal contre les protéines A2, mAvC9 (Zhang *et al.*, 1996)

Survie de *L. donovani* (LV9) dans les J774

Pour déterminer le taux de survie des *L. donovani* dans les macrophages, des cellules (J774) adhérentes ont été infectées avec des parasites exprimant la luciférase (La souche LV9 provient d'Éthiopie et a été obtenue de A. Descoteaux, Université du Québec, Institut Armand-Frappier,

Laval, Canada) (St-Denis *et al.*, 1999). Le gène de la luciférase est dans la région intergénique de la tubuline. Des promastigotes, des promastigotes en phase stationnaires transférés à 37°C pour 16-24 heures et des promastigotes en phases stationnaires transférés de pH 7,4 37°C à pH 5,5 37°C pour 24h, 48h et 120h ont été utilisés pour infecter les cultures de macrophages dans un ratio de 10 parasites (1×10^6) par macrophage (1×10^5). Les cellules infectées ont été incubées à 37°C dans du DMEM pour une heure. Les leishmanies non internalisées sont retirées par 3 lavages des macrophages dans du PBS froid. Les macrophages ont ensuite été incubés dans le DMEM et les taux de survie ont été déterminés 1,6,24,48 et 72h après l'infection par mesure de l'activité luciférase dans les cellules.

L'activité luciférase est mesurée dans les extraits de cellules infectées par les leishmanies en utilisant le système « Promega Luciferase Assay Reagent » tel que recommandé par le manufacturier (Promega Corp, Madison, WI). Brièvement, les cellules hôtes sont lysées dans 100µl de 1x « Cell Culture Lysis Reagent) réactif de lyse de culture cellulaire. Ensuite, 20 µl d'extrait cellulaire est mélangé avec 100 µl de « Luciferase Assay Reagent » à la température de la pièce et l'émission lumineuse est quantifiée dans un luminomètre (Berthold, Nashua, NH). Puisque seuls les parasites vivants expriment le gène de la luciférase, l'émission lumineuse produite par la réaction de la luciférase avec son substrat est proportionnelle au nombre de leishmanies vivantes (St-Denis *et al.*, 1999).

Protéomique

Précipitation des protéines

Les cellules sont lavées 3 fois par centrifugation avec du PBS. Le culot est ensuite resuspendu dans une solution constituée d'un tampon de lyse (urée 8M, Thiourée 2M, CHAPS 4% w/v, DTE 40mM, Tris 20mM) et d'une solution de Dnase, Rnase dans un ratio de 10 :1. Le mélange du culot et de la solution doit être translucide. Au besoin, il faut rajouter de la solution de lyse et de la Dnase, Rnase en gardant les proportions (10 :1 respectivement). Les échantillons sont ensuite agités sur un vortex pendant 1 heure à la température de la pièce. Par la suite, on ajoute 4 volumes de MeOH et 1 volume de chloroforme. Les échantillons sont à nouveau agités sur un vortex pendant 15 minutes pour qu'il n'y ait qu'une seule phase. On ajoute aux échantillons 3 volumes d'eau (ultra-pure) et l'on agite sur un vortex pendant 20 minutes. Ensuite les échantillons sont centrifugés pendant 1 minute à vitesse maximale dans une centrifugeuse pour éppendorfs. Les protéines se retrouvent ainsi à l'interface entre la phase organique (chloroforme) sur le dessus et la phase aqueuse (eau et MeOH) en dessous. On enlève alors la phase organique sur le dessus et l'on ajoute 3 volumes de MeOH. Les échantillons sont agités sur un vortex pendant 15 minutes et centrifugés pendant 2 minutes à vitesse maximale dans la centrifugeuse pour éppendorfs. Finalement, on retire le surnageant et on laisse sécher le culot de protéines sous une hotte. Le dosage des protéines (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate 2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547)

se fait sur une fraction du culot resuspendu dans de l'eau. À partir du dosage, on resuspend la quantité de protéines désirées dans le tampon de lyse.

Electrophorèse 2-D

Les protéines provenant des parasites (promastigotes et amastigotes) sont premièrement séparées en fonction de leur point isoélectrique sur une bande de gel dont le gradient de pH est immobile (IPG : Immobilized pH gradient) de 18 cm (Amersham). Les échantillons mis dans la première dimension sont soumis à un champ électrique jusqu'à un total de 65000 volts. À la fin de la première dimension, les bandes de gel sont équilibrées dans une solution contenant 13 mM de DTT pour 10 minutes et sont ensuite mises dans une solution contenant 2,5 % d'iodoacétamide pour une période additionnelle de 5 minutes. Les protéines sont ensuite séparées en fonction de leur poids moléculaire sur un gel de 12 % SDS acrylamide. À la fin de la migration, les gels (18 cm X 20 cm) sont colorés à l'argent pour analyse du patron protéique ou colorés au bleu de Coomassie pour identification des protéines par spectrométrie de masse. La coloration à l'argent est réalisée comme suit : Les gels sont fixés dans un mélange de 40 % éthanol/10% acide acétique pour 60 minutes à la température de la pièce suivi par une fixation de 60min dans une solution contenant 0,5 % glutaraldéhyde, 30% éthanol, 0,25% potassium tetrathionate et 6,8% sodium acetate. Les gels sont ensuite lavés pour 60 minutes avec différents changements d'eau ultra-

pure et colorés dans une solution de 0,2% nitrate d'argent et de 0,025% formaldéhyde pour 30 minutes. Les gels sont finalement développés dans une solution de 3% K_2CO_3 , de 0,015% formaldéhyde v/v et de 0,00075% sodium thiosulfate. Le développement est arrêté dans une solution de 5% Tris 2%/acide acétique v/v. Pour l'analyse en spectrométrie de masse, les gels sont colorés au bleu de Coomassie (BM Fast Stain, méthode modifiée utilisant le Coomassie, Boehringer Mannheim) selon les instructions du manufacturier.

Digestion des protéines

Les taches représentant les protéines d'intérêt sont excisées des gels 2D, lavées dans une solution d'acide citrique de 2% et ensuite lavées et analysées tel que décrit précédemment (Shevchenko *et al.*, 1996). Brièvement, les morceaux de gels sont lavés dans 25 mM NH_4HCO_3 à pH 8 pour 30 minutes, ensuite, dans 50 % acétonitrile et 25 mM NH_4HCO_3 pour un autre 30 minutes et finalement dans de l'eau ultra-pure avant de compléter la déshydratation dans la centrifugeuse aspirante. Les morceaux de gels 2D sont réhydratés avec une quantité minimale d'une solution de trypsine porcine (PROMEGA, Madison, WI, USA) modifiée contenant de 0,25 μg à 0,5 μg de protéase, dépendant de la quantité de protéines (généralement 10 μl d'une solution de 0,05 μg de trypsine/ μl dans 25 mM NH_4HCO_3 contenant 10% d'acétonitrile). Lorsque nécessaire, le tampon NH_4HCO_3 est ajouté jusqu'à ce

que le morceau de gel soit complètement réhydraté. La digestion se fait à 37°C pendant une période de 3 à 5 heures.

Analyse MALDI-MS

Le spectre de masses résultant de la digestion tryptique est acquis sur un spectromètre de masse MALDI-TOF Biflex (Bruker-Franzen Analytik, Bremen, Germany) équipé avec un « gridless delayed extraction ». L'instrument est opéré dans un mode réflecteur où 0,5 μ l de chacun des échantillons (dans 25 mM NH_4HCO_3 / 10 % acétonitrile) est déposé directement sur une sonde échantillon sur une matrice composée d'acide acyano-4-hydroxy-trans-cinnamic (CCA) mélangé avec de la nitrocellulose (mélange 4/3, v/v, d'une solution saturée de CCA dans de l'acétone, et une solution de 5 mg de nitrocellulose dissous dans 1 ml d'isopropanol/acetone, 1/1, v/v). Les dépôts sont lavés avec 5 μ l de 0,1 % de TFA avant l'analyse. Une liste de masse des peptides est obtenue pour chaque protéine digérée. Ce schème de masse peptidique est ensuite soumis à un programme informatique approprié pour identifier les protéines (MS-FIT : <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.2/msfit.htm>, or ProFound : <http://129.85.19.192/prowl-cgi/ProFound.exe>). Quand une protéine ne peut pas être identifiée par le schème de masse peptidique, l'échantillon peptidique est extrait une deuxième fois avec une solution de 50 % acétonitrile-25mM NH_4HCO_3 . La solution et l'extrait sont combinés, séchés dans une

centrifugeuse aspirante et le sel est enlevé avec ZipTip C18 (Millipore, Bedford, Ma, USA) avant l'analyse par « tandem MS nanospray ».

Nanospray-MS/MS

Un instrument Q-ToF (Micromass, Manchester, UK) est utilisé avec une source d'ion Z-Spray qui fonctionne en mode nanospray. Environ 3 à 5 μ l d'échantillon dont le sel a été extrait est introduit dans une aiguille (« medium sample needle », PROTANA Inc.) pour procéder aux expériences de MS et de MS/MS. Le voltage est calibré à 1000 V et l'échantillon à 50 V. Glufibrinopeptide est utilisé pour calibrer l'instrument en mode MS/MS. Le spectre de MS/MS est transformé en utilisant MaxEnt3 (MassLynx, Micromass Ltd), et les séquences d'acides aminés sont analysées en utilisant PepSeq (BioLynx, Micromass Ltd). Les séquences d'acides aminés, les séquences étiquettes ou les (peptide ion fragments) fragments de peptides ionisés qui peuvent être déterminés sont utilisés pour scruter les banques de données de protéines et de EST avec des logiciels spécialisés : Pepfrag (<http://prowl1.rockefeller.edu/prowl/pepfragch.html>), S c a n (<http://dna.stanford.edu/scan>) or BLAST pour trouver des homologies (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>).

Analyse du patron protéique des gels 2-D

Les gels de promastigotes et d'amastigotes sont toujours comparés en parallèle. Les mêmes concentrations de protéines, déterminées par Bradford (Bio-Rad Protéin Assay) sont mis dans la première dimension (Desjardins *et al.*, 1994b). Tous les gels sont faits de façon similaire et colorés (argent ou bleu de Coomassie) pour la même période de temps. Pour l'analyse et la comparaison des patrons protéiques, les gels 2D sont numérisés à haute résolution (600 points par image) en utilisant les mêmes paramètres. La détection des taches, l'alignement des gels et toutes les analyses subséquentes sont faites avec le logiciel Melanie II (BioRad, USA). Ce logiciel permet l'identification des différences de patrons protéiques entre chacun des gels.

RÉSULTATS

Différenciation *in vitro* de *Leishmania donovani*

La transformation de *L. donovani* de promastigote en amastigote a été réalisée dans des conditions qui miment les conditions présentes *in vitro* (Figure 8A). Premièrement, les promastigotes de *L. donovani* en phase stationnaire cultivés dans le milieu M199 modifié dont la croissance s'effectue à une température de 26°C et un pH de 7,4 (miment les conditions optimales pour la croissance des promastigotes à l'intérieur de l'insecte vecteur) sont transférés dans le même milieu, mais sont soumis à une augmentation de température à 37°C et une atmosphère de 5% de CO₂. Ensuite, ils sont transférés dans le RPMI 1640 modifié où ils sont soumis à un abaissement du pH à 5,5 (conditions présentes dans le phagolysosome) et les cellules y sont incubées de 48 à 96 heures. La figure 8.B montre l'altération qui se produit pendant la transformation du promastigote en amastigote axénique quand ceux-ci sont exposés à ces conditions. En fait, nous pouvons observer par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre la tubuline la transformation du promastigote, lequel est long et motile grâce à la présence d'un long flagelle en un amastigote axénique lequel est rond et non motile puisque le flagelle est très raccourci. Nous avons aussi démontré que ces changements morphologiques sont accompagnés par des transformations biochimiques. A2 représentent une famille multi-gène chez *L. donovani* dont les protéines sont surexprimées chez les amastigotes. En fait, l'équipe de

Zhang et collaborateurs ont montré que les protéines A2 sont exprimées chez les amastigotes dérivés de lésions animales et chez les amastigotes axéniques de *L. donovani* (Zhang *et al.*, 1997). Nous avons donc utilisé des anticorps monoclonaux anti-A2 comme marqueur pour déterminer la similitude des caractéristiques biochimiques des amastigotes axéniques obtenus avec les amastigotes dérivés de lésions animales. Tel que démontré dans la figure 8.C, les protéines A2 sont surexprimées chez les amastigotes axéniques comparativement aux promastigotes. Ces résultats concordent avec l'augmentation de l'expression des protéines A2 chez les amastigotes dérivés de lésions animales (Zhang et Matlashewski, 1997).

Survie des *L. donovani* LV9 dans les macrophages (J774)

Des études *in vitro* sur *L. donovani* ont établi que la capacité des promastigotes à infecter les macrophages dépend entre autres de la phase de croissance du parasite : La capacité des promastigotes en phase exponentielle à infecter les cellules de l'hôte est faible comparativement aux promastigotes en phase stationnaires dont le taux d'infectivité est supérieur. (Giannini, 1974; Doran et Herman, 1981; Howard *et al.*, 1987). En fait, les changements dans l'infectivité ont été associés à l'expression différentielle de gènes (Meade *et al.*, 1989), les changements antigéniques (Sacks *et al.*, 1985; Howard *et al.*, 1987; Sacks et da Silva, 1987; Cooper *et al.*, 1988 et Pimenta *et al.*, 1989) et dans les propriétés biochimiques (Doran et Herman, 1981; Mallinson et Coombs, 1989a,b). Pour s'assurer que les changements

morphologiques et biochimiques observés chez les amastigotes axéniques obtenus sont accompagnés d'une capacité accrue à survivre à l'intérieur des phagolysosomes, nous avons regardé le taux de survie de *L. donovani* LV9 transfectés avec le gène de la luciférase tout au long de sa transformation de promastigote en amastigote *in vitro*. Nous avons donc infecté des macrophages (J774) avec ces parasites transfectés, à différents stades de leur différenciation de promastigote en amastigote. Les résultats de la figure 9 démontre qu'après 72 heures à l'intérieur des macrophages, les parasites qui ont été soumis à la hausse de température (LV9 pH 7,4 37°C 24 h) montrent une capacité à survivre à l'intérieur des macrophages 5 fois plus élevée que les promastigotes. De même, il y a presque 10 fois plus et 3 à 5 fois plus d'amastigotes axéniques (LV9 pH5,5 37°C 72h) qui survivent dans les macrophages que de promastigotes et que de parasites soumis à la hausse de température seulement. Il semble donc que plus la différenciation des promastigotes en amastigotes progresse, plus les parasites deviennent aptes à survivre dans les macrophages. De nouvelles protéines doivent être synthétisées puisque le parasite acquiert de nouvelles propriétés. Ces protéines seraient des facteurs de virulence qu'on se propose d'identifier. À plus long terme, nous étudierons donc la fonction de ces protéines par des essais de survie dans les macrophages avec des parasites dont les protéines d'intérêt auront été mutées.

Expression différentielle des protéines de *Leishmania donovani*.

Les résultats décrits plus tôt quant aux changements morphologiques et biochimiques encourus lors de la différenciation des parasites de promastigote en amastigote et aux différences dans le taux de survie des amastigotes, suggèrent la modulation de l'expression de plusieurs gènes. Nous pensons que l'expression différentielle du marqueur A2, qui semble être une protéine de structure (Zhang, 1997) ne peut expliquer à elle seule tous les changements qui surviennent suite au transfert du parasite de la mouche des sables au phagolysosome et sa capacité à survivre à l'intérieur de ce nouvel environnement. De façon à identifier d'autres événements moléculaires associés aux amastigotes, nous avons comparé par électrophorèse en gel 2D l'expression protéique de *L. donovani* dans chacun de ces stades, soit promastigote et amastigote. Tel que montré dans les figures 10 et 11, on observe une trentaine de protéines qui sont exprimées différemment entre le promastigote et l'amastigote axénique chez *L. donovani*. Afin de prouver l'efficacité de cette approche dans la détermination des molécules exprimées différemment par le parasite durant sa transformation, nous avons regardé l'expression de la β -tubuline (50 kDa) identifiée par spectrométrie de masse et pour laquelle une diminution de l'expression chez les amastigotes est reconnue. La figure 12 démontre bien que son expression diminue à mesure que le flagelle du parasite qui se différencie en amastigote raccourci.

Parmi les protéines exprimées différemment que nous avons commencé à identifier (figures 13 à 15), on retrouve des protéines déjà connues : Trois protéines de choc thermique; HSP83, HSP10 et la HSP70, la glutathione peroxidase (GP), le facteur d'elongation 2 (EF-2), la glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) et la S-Adenosylmethionine synthetase (SAMs). On retrouve aussi 5 protéines dont aucune équivalence permettant de les identifier n'est disponible dans les banques de données. La protéine #200 semble être exprimée spécifiquement chez le stade amastigote puisqu'il semble n'y avoir aucune expression de cette protéine chez les promastigotes.

FIGURES ET LÉGENDES

Figure 8.

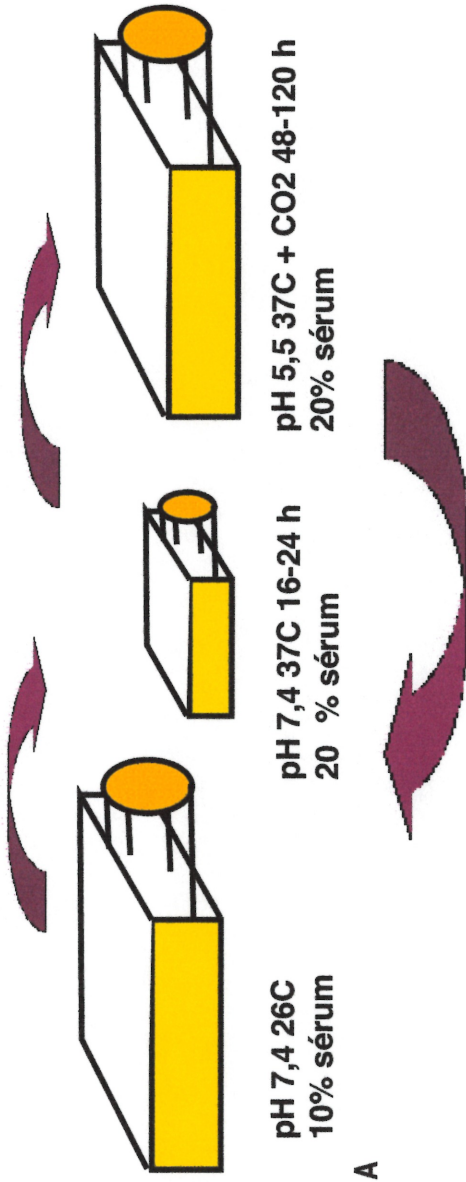
Schéma illustrant les techniques de la différenciation *in vitro* de *L. donovani*, immunomarquage en fluorescence de l'alpha-tubuline des leishmanies pendant leur différenciation de promastigotes en amastigotes et immunobuvardage avec des anticorps monoclonaux contre les protéines A2.

A) Conditions requises pour la différenciation des promastigotes en amastigotes. Les promastigotes en phase stationnaire sont cultivés dans le milieu M199 modifié contenant 10 % de sérum. Le pH est à 7,4 et la température à 26°C. Ils sont premièrement transférés à 37°C dans le même milieu mais contenant 20 % de sérum pour une période de 16 à 24h dans une atmosphère de 5% CO₂. Ensuite, les parasites sont transférés dans le RPMI1640 modifié, avec un pH à 5,5, 20 % de sérum et à une température de 37°C. B) Immunofluorescence des promastigotes de *L. donovani* (à gauche) et des amastigotes axéniques (à droite) fixés dans du 20% méthanol/80% acétone et réagissant avec des anticorps anti-tubuline de souris. La révélation est réalisée par des anti-souris IgG conjugués à ALEXA (1/500) (Molecular Probes). On note le changement de morphologie des parasites tout au long de leur différenciation de promastigote à amastigote. Le corps s'arrondit et le flagelle se raccourcit. C) Immunobuvardage des protéines A2 chez *L. donovani* : Pro, promastigotes ; Ama, amastigotes. Des quantités équivalentes de protéines extraites de 1X10⁷ cellules ont été

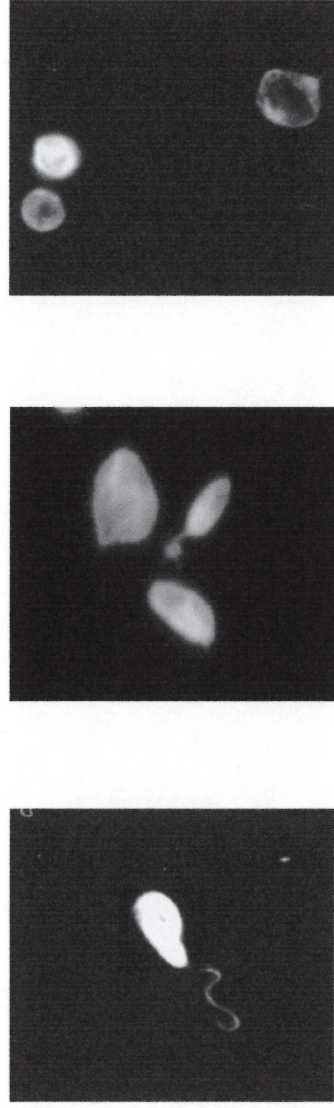
séparées sur un gel SDS-PAGE 10% acrylamide. L'immunobuvardage est réalisé avec des anticorps monoclonaux anti-A2. La synthèse de protéines A2 est plus importante chez les amastigotes axéniques que les promastigotes.

Promastigote **Amastigote axénique**

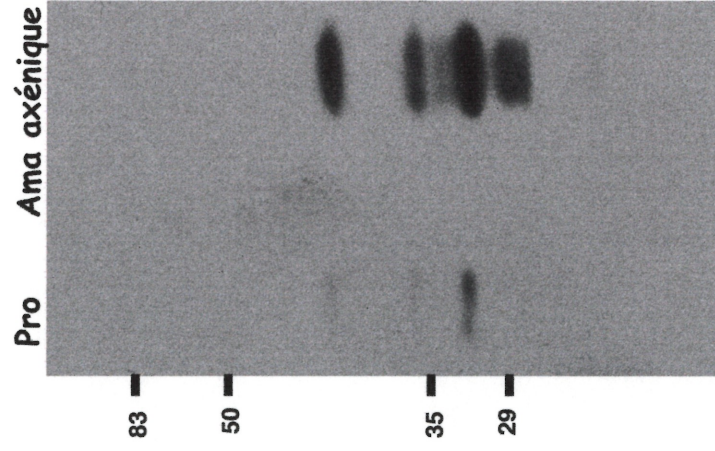
Leishmanies en phase stationnaire



A



B



Expression différentielle de A2

C

Figure 9.**Test de survie des *L. donovani* (LV9) dans les macrophages J774.**

Les promastigotes, les promastigotes en phase stationnaires transférés à 37°C pour 16-24 heures et les promastigotes en phase stationnaire transférés de pH 7,4, 37°C à pH 5,5, 37°C pour 24,48 et 120 heures ont été utilisés pour infecter des cultures de macrophages J774 dans un ratio de 10 parasites/macrophage. Les taux de survie ont été déterminés 1,6,24,48 et 72 h après l'infection par mesure de l'activité luciférase dans les extraits cellulaires. On note qu'il y a plus d'amastigotes qui survivent dans les macrophages que de promastigotes.

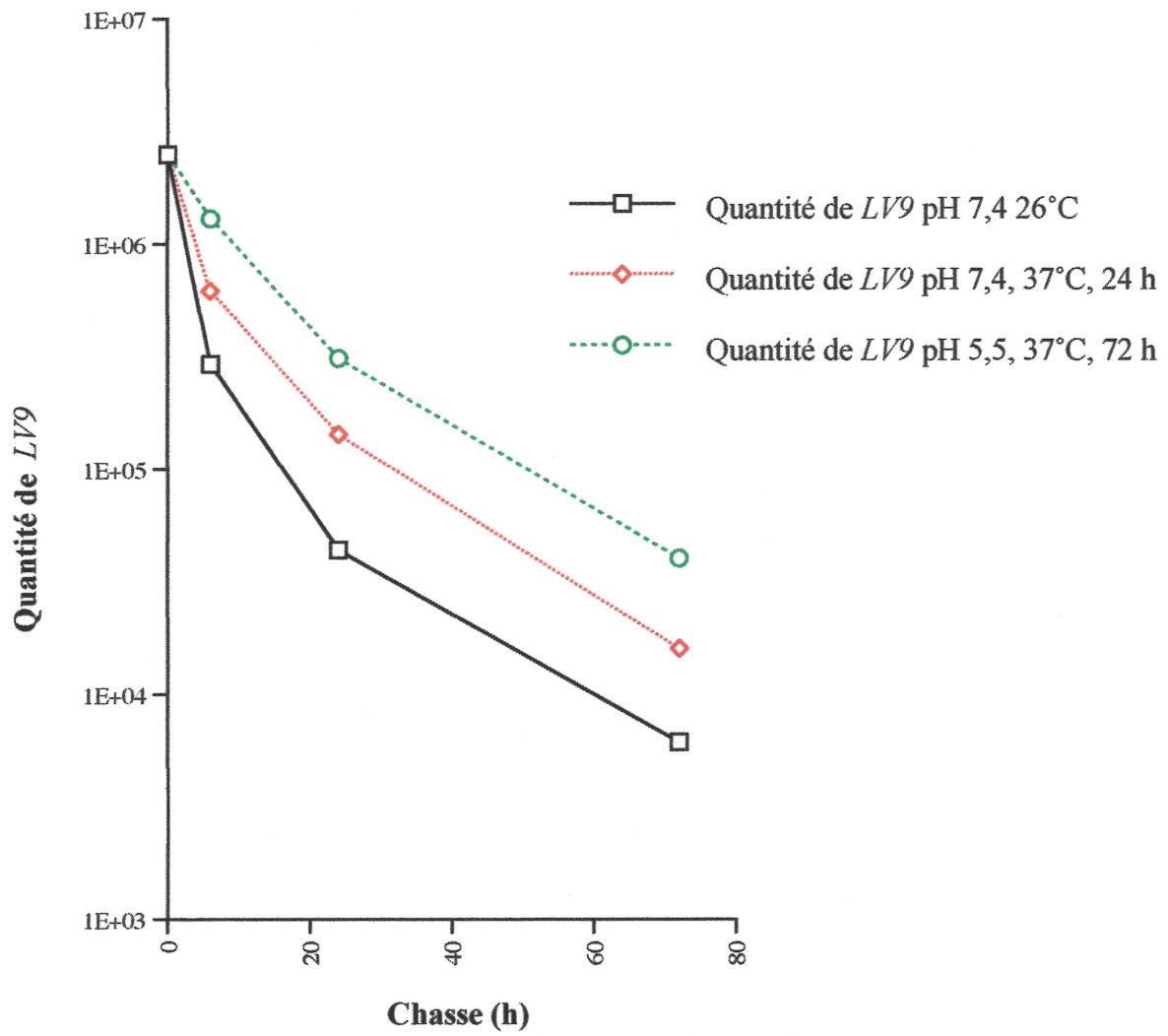


Figure 10.**Analyse protéomique des extraits protéiques des promastigotes et des amastigotes de *L. donovani* sur bande de gel de pH 3-10.**

Gels 2D de protéines extraites de promastigotes (haut) et d'amastigotes (bas) de *L. donovani* effectués avec bande de gel dont le gradient de pH 3-10 est linéaire. Les taches indiquées par une flèche représentent les protéines différenciellement exprimées, sur-exprimées ou sous-exprimées entre les 2 stades du parasite.

Figure 11.**Analyse protéomique des extraits protéiques des promastigotes et des amastigotes de *L. donovani* sur bande de gel de pH 4-7.**

Gels 2D de protéines extraites de promastigotes (haut) et d'amastigotes (bas) de *L. donovani* effectués avec bande de gel dont le gradient de pH 4-7 est linéaire. Les taches indiquées par une flèche représentent des protéines dont la régulation, déterminée par l'intensité des taches, est différente entre les 2 stades du parasite.

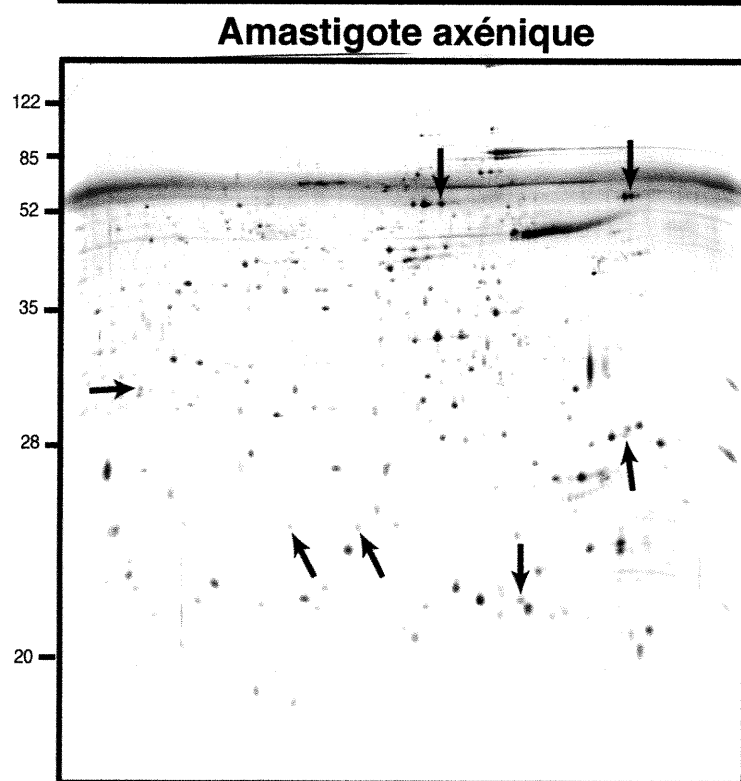
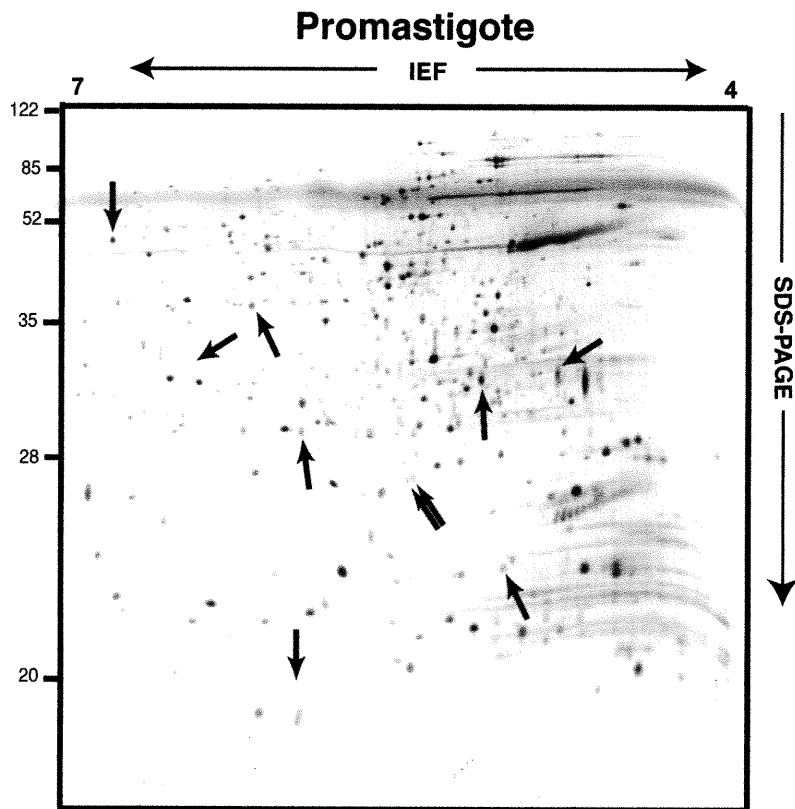
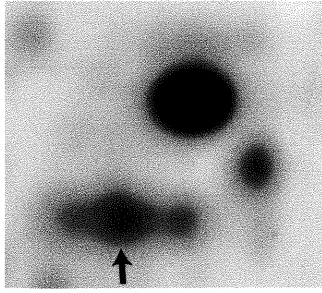


Figure 12.

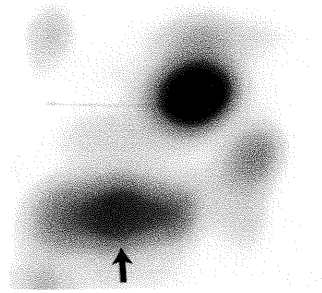
Analyse en gel 2D de la régulation de la β -tubuline pendant la différenciation *in vitro* de *L. donovani* de promastigote en amastigote.

Les flèches pointent la β -tubuline (identifiée selon le patron de spectrométrie de masse). On note que son expression diminue pendant la différenciation du parasite promastigote-amastigote. Cette diminution dans l'expression de la β -tubuline corrèle avec le raccourcissement du flagelle.

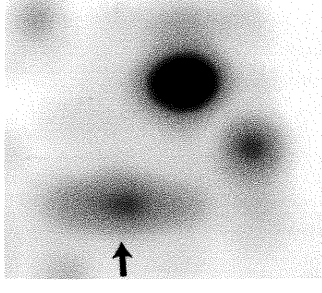
Promastigote



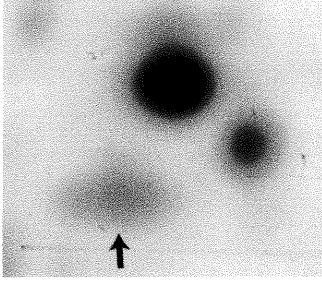
8hrs pH7,4 37°C



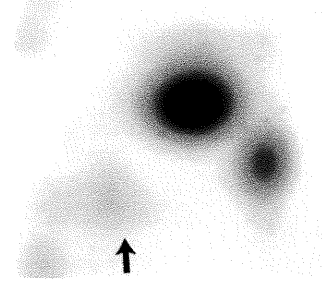
48h pH5,5 37°C



72h pH 5,5 37°C



96h pH 5,5 37°C



Spectrométrie de masse

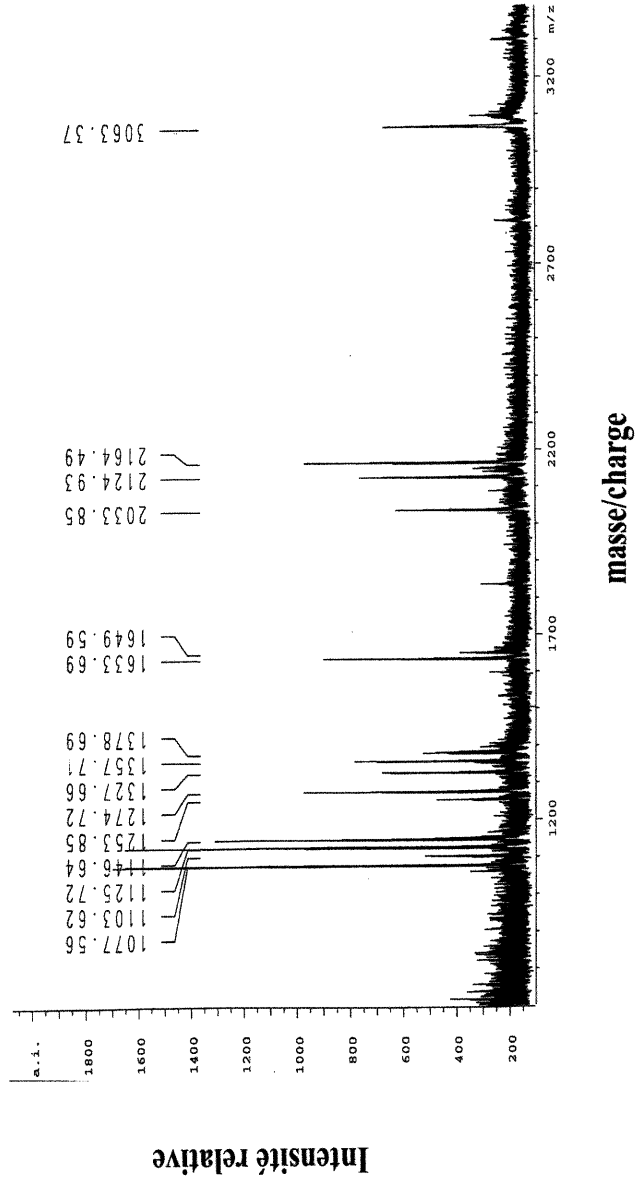


Figure 13.

Identification des protéines exprimées différemment entre le stade promastigote (haut) et amastigote (bas) de *L. donovani* sur gels 2D effectués avec bande de gel de pH 3-10.

Les taches encadrées ont été identifiées par spectrométrie de masse. Les séquences en acides aminés ont été obtenues par Q-tof.

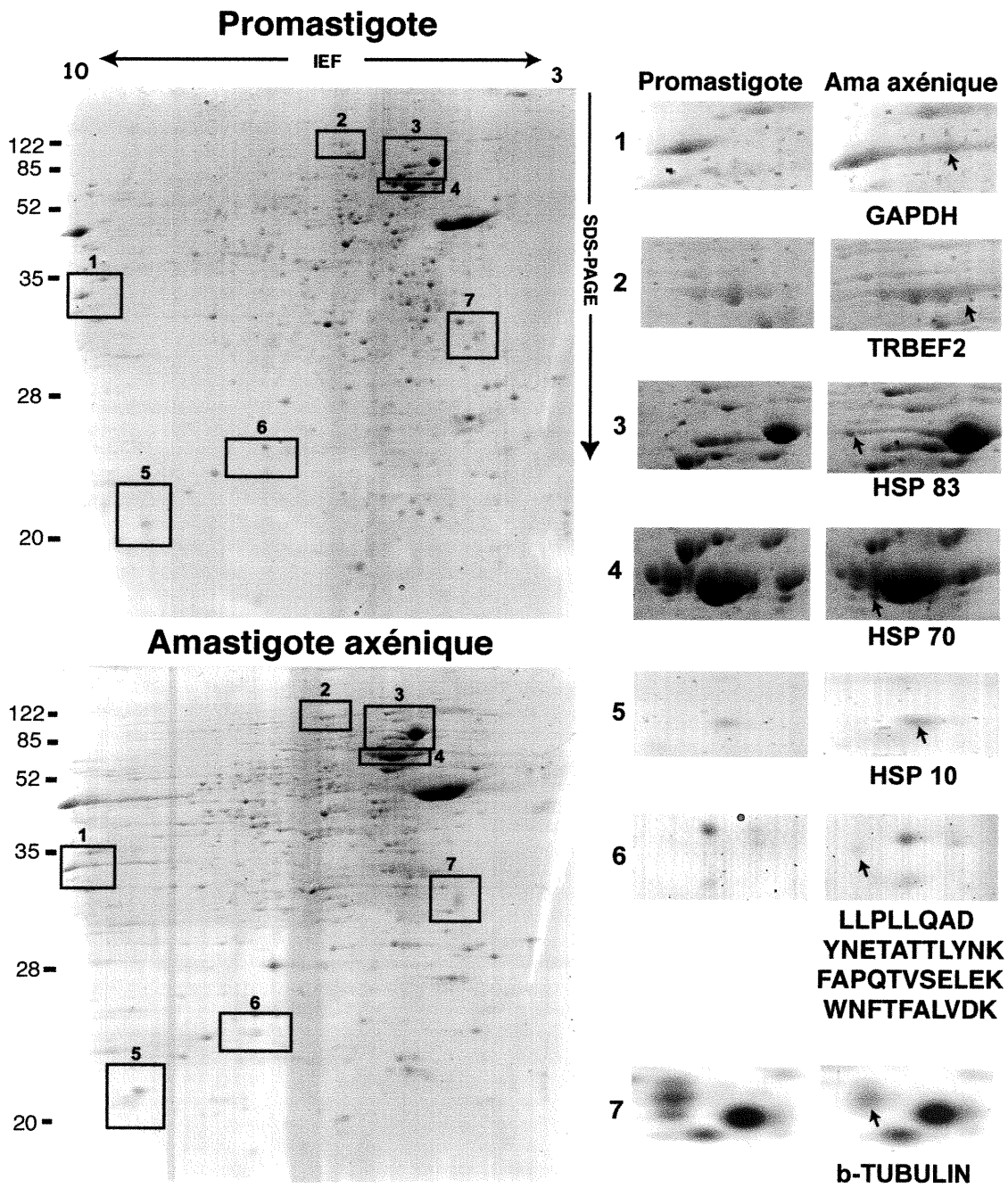
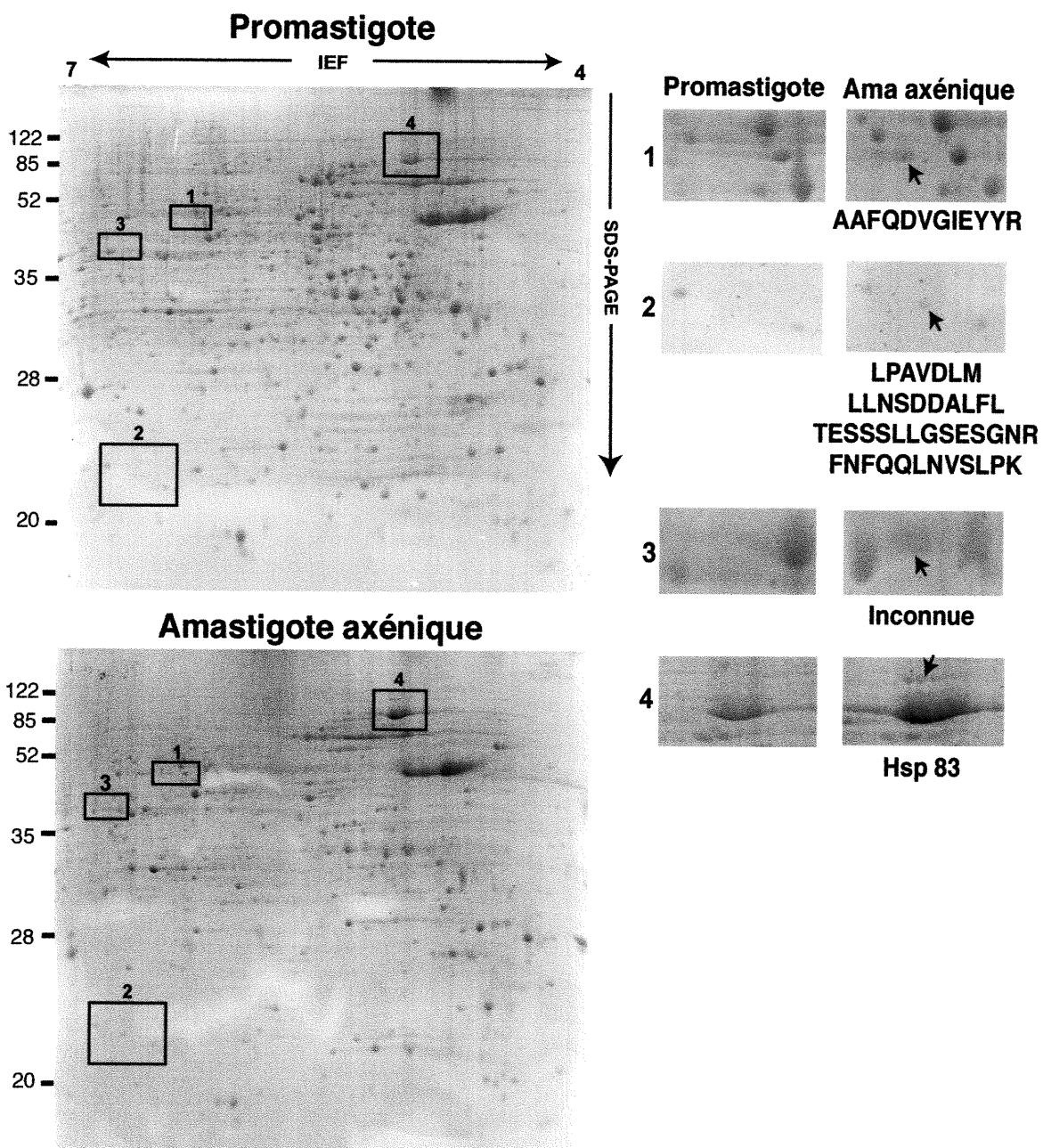


Figure 14.

Identification des protéines exprimées différemment entre le stade promastigote (haut) et amastigote (bas) de *L. donovani* sur gels 2D effectués avec bande de gel de pH 4-7.

Les taches encadrées ont été identifiées par spectrométrie de masse. Les séquences en acides aminés ont été obtenues par Q-tof.



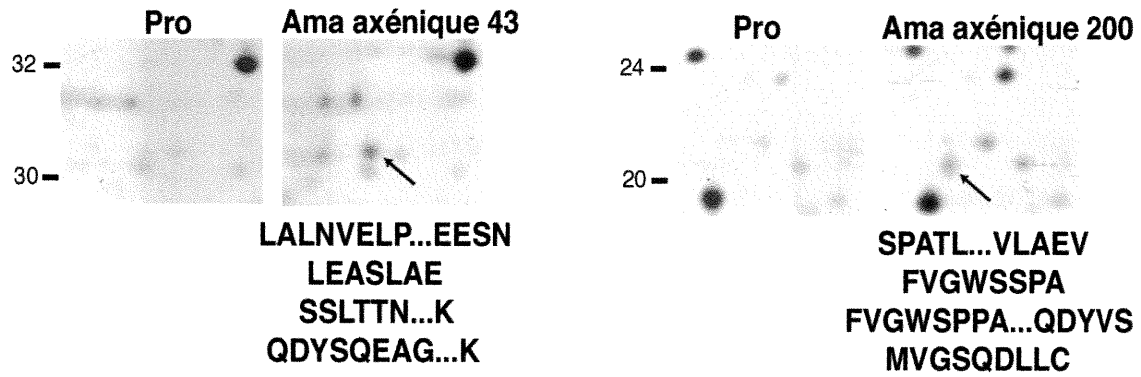


Figure 15. Identification des protéines exprimées différemment entre le stade promastigote et amastigote de *L. donovani* sur gels 2D effectués avec bande de gel de pH 4-7. Protéines inconnues #43 et 200 surexprimées chez le stade amastigote identifiées par spectrométrie de masse, mais non identifiées sur le gel présenté à la figure 14.

HSP10 **MK**FQPLGERV** LV**ERLEEENK TSSGIIIPDN AKEKPLMGVV
KKLQPLGQRV** LV**

HSP10 KAVSHKISEG CKCVKEGDVI AFGKYKGAEI VLDGTEYML

HSP10 ELEDILGIVG SGSCCHTGNH DHKHAKEHEA CCHDHKKH

Figure 16. Alignement de séquence de la chaperone Hsp10 d'*Helicobacter pylori* avec le peptide de Hsp10 de *L. donovani*.

L.major GP: MSYDFKVN~~GS~~DHQPYDLGQHKGHPLLIYNVASKCGFTKGGY**ETATALYN** 50
L.dono GP **YNETATTLYN**

L.major GP: **K**YKHLGFMVLA**FPCNQFAGQEPGTEEEVKSFACTRFKAEFXXXXXXXXXX** 100
L.dono GP **K**

L.major GP: XXXXXXXXXXXH**Y**LKNTCKGILGTTLVK**WNFTAFLVDK**DGHAVCRA**FAPGQTV** 150
WNFTAFLVDK **FAP - QTV**

L.major GP: **SELEK**KLL**PLLQA**AASSKI- 169
L.dono GP **SELEK LLPLLQAD**

Figure 17. Alignement de séquence de la glutathione peroxidase de *Leishmania major* avec les peptides de la glutathione peroxidase de *L. donovani*

Tableau 5. Caractéristiques sommaires des protéines exprimées différemment entre le stade promastigote et amastigote et identifiées par spectrométrie de masse

Nom protéine	Numéro d'accèsion	Référence	ProtParam		Observed		Remarques	MALDI-TOF-MS	
			P.M.	pI	P.M.	pI		Peptides	Séquence couverte
GAPDH	Q27890	Mol. Biochem. Parasitol. 55:115-126 1992	38,9	9,1	32	9,3	Phosphorylation du GAP en BPG; Activité catalytique: D-Glyceraldéhyde 3-Phosphate + Orthophosphate + NAD (+) = 1,3-Diphosphatedéhydate + NADH. Voie métabolique: Première étape de la seconde phase de la glycolyse. Localisation subcellulaire: Glycosome. Similitude: Appartient à la famille des glyceraldéhyde 3-Phosphate dehydrogenase.		25%
Facteur d'élongation 2	BAA09433	J.Biochem (Tokyo)119:70-9 1996	86,1	5,8	120	6,2	Homologue à <i>T. cruzi</i> EF2. Translocation de peptidyl-tRNA sur le ribosome		21%
HSP83	P27890	J.Clin.Microbiol. 30:330 1992	52,7	5,7	85	5,1	Fonction: Chaperone. A une activité ATPase. Localisation subcellulaire: Cytoplasmique. Similitude: Appartient à la famille des protéines de choc thermique		21%
HSP70	S11448	Eur. J. Biochem. 190:377 1990	71,2	5,4	65	5,7	chaperone		12%
HSP10	P48225	Mol. Microbiol. 14:959 1994	13,0	6,1	12	8,7	Fonction: se lie au CPN60 en présence d'ATP et supprime l'activité ATPase. Similitude: Appartient à la famille de chaperones GroES. Structure: Heptamère de 7 sous-unités arrangés en anneaux. <i>Helicobacter pylori</i>	KKLQLGLQRVLY	
Inconnu	-	-	-	-	40	6,3		AAFQYVGEYYR	
Inconnu	-	-	-	-	23	6,5		LPAYDLM LINSDDALFL TESSLLGSEGNR FNFQQLNVSLPD	
S-adenosyl methionine synthetase	O43938	-	43,1	5,5	80	5,2	Fonction: Catalyse la formation de la S-adenosylmethionine à partir de la methionine et l'ATP. Activité catalytique: ATP + Methionine + H2O = Orthophosphate + Pyrophosphate + S-Adenosyl-L-Methionine. Mode d'action: Active le cycle des methyls. Similitude: Appartient à la famille des Adomet synthetases. <i>L. infantum</i>		28%
Glutathione peroxydase	AL160493.2	-	18	-	25	8	Homologie avec la glutathione peroxydase de <i>L. major</i>	LPLLQAD YNETATLYNK FAPQIVSELEK WNFTFALYDK	
Inconnu 43	-	-	-	-	31	6,3		LAINVELP EESN LEASLAE SSSLTN K QDYQSEAG K	

DISCUSSION

14 Différenciation de *Leishmania donovani in vitro*

Dans cette étude, à cause des difficultés à obtenir des quantités suffisantes d'amastigotes viables sans contamination de la cellule hôte, nous avons utilisé un système *in vitro* pour réaliser la différenciation des promastigotes en amastigotes axéniques. Comme le démontre la figure 8, en mimant les conditions présentes à l'intérieur de la mouche des sables (pH 7,4 ; 26°C) et à l'intérieur de la vacuole parasitaire (pH 5,5; 37°C), nous avons obtenu des amastigotes axéniques. Le système nous a permis de montrer que les amastigotes axéniques obtenus dans ces conditions sont morphologiquement identiques aux amastigotes axéniques obtenus de lésions animales : ronds et non mobiles. De même, ils sont différents des promastigotes : longs et mobiles.

15 Protéines A2

De façon à s'assurer que les amastigotes axéniques ainsi obtenus présentent non seulement les critères morphologiques spécifiques aux vrais amastigotes, dérivés de lésions animales, mais aussi des caractères biochimiques, nous avons utilisé un marqueur spécifique : le groupe de protéines A2. Actuellement, il s'agit du seul groupe de protéines de virulence découvert chez *L. donovani* comme étant spécifique au stade amastigote. La

famille de protéines A2 est requise pour la survie de *L. donovani* à l'intérieur des macrophages (Zhang et Matlashewski, 1997) et leur expression est spécifique au stade amastigote, que ceux-ci soient dérivés de lésions animales ou qu'ils aient été obtenus *in vitro* en culture axénique (Ghedini *et al.*, 1997).

Ce marqueur est donc d'un grand intérêt dans la caractérisation biochimique de nos amastigotes obtenus *in vitro*. L'immunobuvardage avec des anticorps dirigés contre les protéines A2 effectué avec des promastigotes et des amastigotes axéniques cultivés *in vitro* nous démontre que l'expression des protéines A2 est beaucoup plus importante chez les amastigotes axéniques que chez les promastigotes. Ainsi, ce système de culture des parasites *in vitro* permet la différenciation des promastigotes en amastigotes axéniques semblables à ceux qui sont isolés de lésions animales de par leur morphologie (corps rond, flagelle courte) et la surexpression des protéines A2.

16 Essais de survie dans les macrophages

Parallèlement, les résultats quant au taux de survie, présentés à la figure 9, démontrent que la capacité à survivre à l'intérieur des phagolysosomes augmente au fur et à mesure que la transformation du parasite de promastigote en amastigote progresse. Ces résultats suggèrent donc une modulation dans l'expression de plusieurs gènes permettant l'acquisition de nouvelles propriétés. Ces facteurs de virulence

graduellement exprimés seraient responsables du taux de survie plus élevé observé chez les amastigotes. Bien que ce ne soit pas la même souche de *L. donovani* qui a été utilisée pour faire les essais de survie, la souche LV9 semble se comporter comme la souche 1S2D au niveau de la différenciation *in vitro*. En effet, on observe les mêmes changements morphologiques (résultats non montrés) et les mêmes caractéristiques biochimiques quant à la surexpression des protéines A2 chez les amastigotes (Charest et Matlashewski, 1994).

17 Analyse protéomique de *L. donovani*

17.1 Avantages de l'approche utilisée

L'ensemble des résultats obtenus suggère une modulation importante dans l'expression de plusieurs protéines. Pour une meilleure compréhension des mécanismes responsables de ces changements, il est important d'identifier toutes les protéines différenciellement exprimées entre les promastigotes et les amastigotes. Puisque la régulation génique chez les espèces de *Leishmania* est plutôt post-transcriptionnelle (Donelson *et al.*, 1999), nous avons eu recours, contrairement aux autres équipes, à une approche protéomique par électrophorèse en gel 2D. L'utilisation de l'électrophorèse en gel 2D est privilégiée au SDS-PAGE puisqu'elle permet une séparation des protéines non seulement selon leur poids moléculaire

mais aussi selon leur point isoélectrique. Cela nous permet donc de localiser différents isomères d'une même protéine ayant subi des modifications post-traductionnelles modifiant le point isoélectrique par exemple. Cela nous permet aussi de localiser une plus grande quantité de protéines puisque deux protéines différentes peuvent avoir le même poids moléculaire, mais pas le même point isoélectrique. La méthode utilisée permet d'obtenir des gels de hautes résolutions (600 points par image), très clairs et qui sont très reproductibles. Ainsi, il est facile de comparer les patrons protéiques des promastigotes versus amastigotes d'un essai à un autre. La modulation dans le niveau d'expression de certaines protéines a donc pu être clairement défini à l'aide de l'outil informatique Melanie II. Avec l'utilisation de différents intervalles de pH (3-10 et 4-7), nous avons localisé plusieurs centaines de protéines et nous en avons observées plus d'une trentaine exprimée différemment (promastigotes versus amastigotes) (figures 10 et 11). Contrairement, par les techniques génomiques, les équipes précédentes ont observé moins d'une dizaine de transcrits dont l'expression est modulée.

La spectrométrie de masse (MALDI-TOF, MS/MS Q-TOF) nous permet d'identifier les protéines d'intérêts. Cette technique est très sensible, précise et rapide. En mode MS, l'appareil utilisé génère des ions de la phase solide de l'échantillon et mesure leur masse par l'intermédiaire de leur temps de vol dans un tube « Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation time of flight mass spectrometry » (MALDI-TOF). L'identification des protéines est réalisée par la création d'une empreinte via la masse des peptides de la protéine. Les

protéines sont donc digérées avec la trypsine qui coupe les résidus lysine ou arginine en C terminal. La masse des peptides ainsi générée est comparée avec les masses peptidiques théoriques des protéines présentes dans les banques de données. Lorsque l'empreinte peptidique ne correspond à aucune des protéines répertoriées dans les banques de données, l'appareil est utilisé pour séquencer précisément les acides aminés des peptides. Les acides aminés sont alors retirés un à un de N-terminal vers C-terminal. Le « Quadruple time of flight » (Q-TOF) en mode MS/MS où la génération des ions est faite par un « electrospray ionisation » est alors utilisé.

17.2 Limites de l'approche utilisée

L'approche protéomique développée a certaines limites. Les gels faits de routine pour comparaison sont colorés à l'argent puisque la coloration est très sensible et nécessite peu de matériels. Cependant, cette coloration n'est pas compatible avec la spectrométrie de masse. On a dû utiliser une coloration au bleu de Coomassie. Cependant, cette coloration est moins sensible, donc certaines protéines identifiées par la coloration à l'argent sont plus difficiles à localiser avec la coloration au bleu de Coomassie. Il est à noter qu'une nouvelle coloration à l'argent pouvant être utilisée avec la spectrométrie de masse est maintenant disponible, ce qui devrait éliminer ce problème.

De plus, il y avait chevauchement dans l'emplacement de certaines protéines de poids moléculaire et point isoélectrique très similaires rendant

leur localisation difficile sur les gels faits (12% acrylamide et intervalle de pH 4-7 et 3-10). De même, les protéines dont le poids moléculaire ou le point isoélectrique est au-delà des intervalles étudiés n'ont pas pu être visualisées. Par contre, ces limites peuvent être facilement diminuées avec la fabrication de gels de pourcentage d'acrylamide variable et l'utilisation d'intervalles de pH différents, maintenant disponibles (ex. 6-11, 4-5).

17.3 Validation de l'approche protéomique

17.3.1 β -tubuline

Parmi les protéines identifiées, nous avons identifié une protéine dont l'expression est nettement diminuée chez les amastigotes. Ce résultat nous a permis de valider notre approche en gel 2D, puisque les modulations observées sur les gels 2D sont conformes aux événements intracellulaires. En effet, il est reconnu que l'expression de la β -tubuline est diminuée chez les amastigotes pendant le processus de différenciation de *L. donovani* (Bhaumek et Adhya, 1991). Cette diminution corrèle avec le raccourcissement du flagelle tel que montré à la figure 8.B, puisqu'il y a induction de la tubuline pendant la différenciation de l'amastigote (sessile) en promastigote, flagellé et mobile (Fong et Chang, 1981).

17.3.2 Protéines identifiées

Notre approche validée, nous avons ensuite procédé à l'aide du logiciel Melanie II à l'analyse des protéines différentiellement exprimées entre les promastigotes et les amastigotes de *L. donovani*. Notre choix s'est plutôt arrêté sur les protéines surexprimées ou exprimées uniquement chez les amastigotes, basé sur l'hypothèse que ce sont ces protéines qui jouent un rôle clé dans la survie des amastigotes à l'intérieur du phagolysosome. On est tout de même conscient que les protéines dont l'expression est diminuée ou inhibée jouent probablement un rôle tout aussi important. L'identification de ces protéines sera donc aussi réalisée, mais dans un deuxième temps. Parmi la trentaine de protéines exprimées différentiellement (figures 10 et 11), nous en avons identifié 13 (figures 13,14 et tableau 5). Il est à noter que ce projet n'en est qu'à ses premiers balbutiements. En fait, l'identification spécifique de toutes les protéines exprimées différentiellement (ce qui nécessitera la variation de différents paramètres techniques comme l'utilisation de gels de différents gradients de pH) entre les promastigotes et amastigotes avec leurs rôles respectifs ainsi que l'interrelation entre chacun est un projet qui nécessitera encore beaucoup de temps et d'efforts.

Parmi les protéines que nous avons commencées à identifier, se retrouvent des protéines déjà connues : Hsp83, Hsp10, GP, EF-2, GAPDH et Hsp70. Cependant, pour plusieurs, il s'agit de leur première identification chez *L. donovani* (tableau 5). Il en est de même pour la démonstration de l'expression différentielle entre le stade promastigote et amastigote.

Nous avons aussi identifié 5 protéines qui ne sont pas répertoriées. En fait, pour celles-ci nous avons la séquence en acides aminés de quelques peptides. Nous ne les analyserons pas à cause du faible nombre d'acides aminés obtenus. Néanmoins, nous sommes très conscients que les protéines inconnues sont d'une importance clé puisqu'elles sont probablement uniques aux Trypanosomatidae, si ce n'est au genre et à l'espèce *Leishmania donovani*. Celles qui sont identifiées comme étant surexprimées chez le stade amastigote jouent probablement un rôle primordial dans la survie du parasite à l'intérieur du phagolysosome. De plus, il sera très intéressant de comparer régulièrement la séquence de ces peptides avec les banques de données puisque plusieurs projets de séquençage sont présentement en cours, d'autant plus que le séquençage complet de *L. major* devrait être complété d'ici peu (Myler, 2000). Pour les protéines suivantes : GAPDH, SAMs, EF-2 et Hsp70, bien que les résultats suggèrent une augmentation de leur expression chez le stade amastigote (sauf pour la SAMs dont l'expression est diminuée), les essais sont à poursuivre à cause des limites techniques expliquées à la section 17.2. Il est à noter qu'aucune des protéines du groupe A2 n'a été identifiée jusqu'à présent. Peut-être que cela est dû aux limites de la méthode utilisée et parce que nous n'avons pas encore identifié toutes les protéines exprimées différemment. On peut penser qu'elles seront prochainement identifiées puisque cette étude se poursuit. Leur identification pourrait aussi être réalisée en immunobuvardage avec les anticorps anti-A2.

18 Analyse de quelques protéines identifiées

18.1 Hsp10

L'analyse de la protéine de 12 kDa a permis de supposer que celle-ci pourrait être membre de la famille des GroES présente chez les procaryotes (Hsp10 ou Cpn10 chez les eucaryotes). Cette supposition se base sur le poids moléculaire estimé de 22 kDa de la protéine et la séquence de 9 acides aminés obtenue qui est quasi identique à une portion de la protéine HspA (118 acides aminés membre de la famille des GroES, identifiée chez *Helicobacter pylori* (figure 16).

Les Hsp10 sont les co-chaperones partenaires des Hsp60 (GroEL chez les procaryotes) (figure 18). Les Hsp 60 sont arrangées en deux anneaux de 7 sous-unités chacune, de 57 kDa liés de façon à former une unité cylindrique. Par des études de microscopie électronique, il a été suggéré que les polypeptides sont liés dans la cavité centrale formée par les sous-unités dans chacun des anneaux. (Braig *et al.*, 1993). En fait, ensemble, i.e. le GroEL avec sa co-protéine GroES, le complexe facilite le repliement de polypeptides (non-natifs) qui s'y lient d'une façon ATP-dépendante, par la création transitoire d'une cavité où le repliement des protéines prend place. En fait, la liaison et l'hydrolyse d'ATP introduisent une série de changements conformationnels et un cycle alternant entre une forte et faible affinité pour des substrats protéiques non natifs. La liaison de l'ATP

entraîne le relâchement des protéines non-natives (Farr *et al.*, 1997 et Weissman *et al.*, 1994). L'augmentation de ceux-ci induit une diminution de l'affinité pour les polypeptides non-natifs et une augmentation de l'affinité pour l'ATP (Jackson, 1993; Sfaniforth *et al.*, 1994 et Yifrach *et al.*, 1996). De même, en présence d'ATP, il y a liaison du GroES au GroEL, formant ainsi une large chambre qui encapsule les substrats protéiques pour leur repliement. L'hydrolyse d'ATP induit le relâchement de GroES, ouvrant ainsi la chambre. Un peptide incorrectement replié retourne dans le GroEL. En fait, GroES semble tout simplement servir de clapet qui ferme la cavité du GroEL, mais qui induit d'importants changements conformationnels (Roseman *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1997) et sans lequel le repliement de certaines protéines s'avère compromis (Fenton *et al.*, 1996). Comme les conditions *in vivo* sont extrêmement défavorables au repliement des protéines, il semble que la cavité du complexe soit essentielle dans la cellule puisqu'elle procure un environnement propice au repliement (Weissman *et al.*, 1995; Weissman *et al.*, 1996 et Mayhew *et al.*, 1996). Ainsi, en situation de stress, par exemple dans le phagolysosome, la forme de cage de la chaperone peut s'avérer essentielle non seulement pour chaperonner une variété de protéines, mais aussi pour les chaperonner assez rapidement afin de garder la cellule en vie. Ce GroES identifié chez *H. pylori* et nommé HspA, a un motif unique lui conférant un rôle dans la chélation des ions nickel et une interaction avec l'enzyme uréase impliquée dans la virulence de ce pathogène qui habite l'environnement hostile de l'estomac et qui est

responsable de divers troubles dont la gastrite. De plus, cet antigène est reconnu par le sérum des patients. Quant à la protéine identifiée, il serait donc intéressant d'obtenir la séquence complète de la protéine puisqu'entre espèces, certaines régions du GroES diffèrent (Suerbaum *et al.*, 1994) et d'analyser son potentiel immunogène. Chez *L. donovani*, le fait que les transcrits de Cpn60 soient augmentés de 2,5 fois chez les amastigotes axéniques (Schluter *et al.*, 2000), suggère qu'il y a possiblement une augmentation décelable au niveau protéique chez les amastigotes versus les promastigotes qui serait accompagnés de l'augmentation des Cpn10. De fait, on note à la figure 13 que l'augmentation de l'expression de cette protéine identifiée est décelable, quoique légère. Une analyse quantitative serait requise pour évaluer ce paramètre.

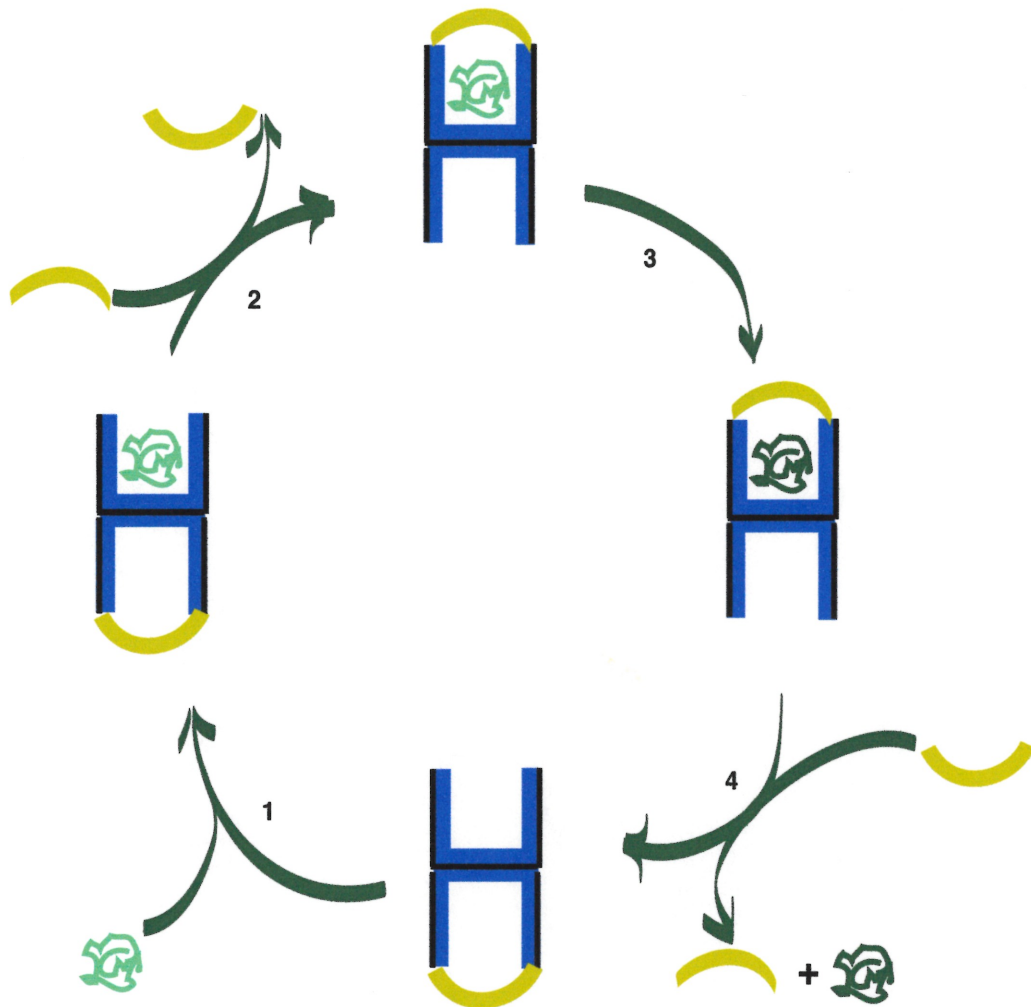


Figure 18. Réaction simplifiée du cycle de repliement des protéines assisté par les chaperones GroEL-EL (HSP60-10).

- (1) Protéine non-native liée à la chambre du complexe GroES-EL. (2) Échange de Gro-ES qui résulte en l'encapsulation de la protéine dans une des chambres
- (3) En présence d'ATP, le repliement des protéines a lieu dans la cavité fermée par le GroES. (4) Le relâchement du GroES et de la protéine résulte en la régénération du complexe prêt à accepter une nouvelle protéine non-native

18.2 Glutathione peroxidase

Les thiols jouent un rôle central dans la défense antioxydative. Les thiols sont une classe de dérivés sulfurés caractérisés par la présence de résidus sulfhydryl (-SH) à leur site actif. La glutathione (GSH) est le plus important thiol cellulaire et est un agent réducteur. Lorsque l'oxydant est neutralisé, il y a formation d'un radical thiyl (GS) puisque le thiol (GSH) est oxydé. Puisque le composé est instable, il y a combinaison de deux radicaux thiyl par ponts disulfures et obtention de la glutathione disulfide (GSSG), aussi connue sous le nom de glutathione oxydée par l'intermédiaire de la glutathione peroxydase. La GSSG est à son tour réduite en GSH par la glutathione disulfide réductase (GSSG reductase). Outre son rôle dans la protection contre les composés oxygène réactifs et les radicaux libres, la glutathione agit en tant que coenzyme dans plusieurs réactions et agit dans des processus de réduction qui sont essentiels pour la synthèse et la dégradation de protéines, la formation de précurseurs déoxyribonucléotides d'ADN et la régulation d'enzymes (Meister et Anderson, 1983).

À la figure 13, on démontre que *L. donovani* surexprime une protéine de 25 kDa qui semble être la glutathione peroxydase. Le Q-tof nous a permis d'obtenir la séquence en acides aminés de quelques peptides. Par recherche dans les banques génomiques, une homologie quasi parfaite est observée entre les acides aminés des peptides obtenus par Q-tof et la séquence en acides aminés déduite de la séquence génomique de la glutathione peroxydase exprimée par *L. major*. La protéine identifiée semble donc être la

glutathione peroxydase, pour la première fois identifiée chez *L. donovani* (figure 17).

La glutathione peroxydase est absente chez plusieurs trypanosomatides (comme *Crithidia fasciculata*) et *Trypanosoma brucei* (Handerson, 1987) et les traces de glutathione peroxydase détectées chez les amastigotes des différentes espèces de *Leishmania* ont souvent été considérées comme des contaminants provenant de la cellule hôte. Avec notre modèle *in vitro* où les parasites croissent en l'absence de cellules hôtes, nous pouvons affirmer que la glutathione peroxydase est produite par le parasite et qu'elle est surexprimée chez le stade amastigote. Ce résultat pourrait donc s'expliquer par la présence accrue de composés oxygène et de radicaux libres lorsque le parasite est dans le macrophage. Le parasite aurait donc besoin par le fait même d'une présence augmentée de molécules protectrices, comme la glutathione.

18.3 SAMs

La synthétase S-Adenolyl-L-Methionine (SAMs) catalyse la formation de la SAM via la méthionine et l'adénosine triphosphate. La SAM est une molécule distribuée dans tous les tissus et elle est un donneur de groupement méthyl (Borchardt *et al.*, 1986). La SAMs est impliquée dans la formation de la trypanothione via la formation indirecte de spermidine (figure 19). La trypanothione, comme la glutathione, est impliquée dans la défense de l'organisme face aux dommages causés par les oxydants (figure 19).

Cependant, elle diffère en ceci qu'elle est unique aux trypanosomatidae qui sont les seuls à pouvoir conjuguer la glutathione et le polyamine spermidine pour former la trypanothione. Chez les trypanosomes, une bonne partie de la glutathione est transformée en trypanothione via le spermidine qui est synthétisé à partir de l'ornithine et de la méthionine. L'implication de la SAMs dans la formation de la trypanothione est réalisée par la formation de SAM transformée en SAMd qui, par la perte d'un méthylthioadénosine est converti en spermidine (figure 19). Étant donné le rôle important joué par la SAM, on peut penser que sa synthèse est régulée et par le fait même que la synthèse de SAMs le soit aussi. Une étude effectuée avec des cellules de persils en culture ayant subi divers traitements (infection avec des champignons) indique une relation serrée entre l'activation du cycle méthyle et la défense contre les pathogènes dans les tissus de feuilles. De fait, le taux de synthèse de SAM est augmenté en condition de stress (Kawalleck P. *et al.*, 1992). Cela démontre une régulation de la SAM. Quant à nos résultats, ils démontrent un niveau d'expression de la SAMs plus important chez le stade promastigote que le stade amastigote. Néanmoins, on peut penser que cette diminution peut être attribuée au fait que les activités métaboliques des amastigotes qui ont une croissance très lente (Saar *et al.*, 1998) soient réduites (Kredich *et al.*, 1986) ou que la méthionine soit utilisée à d'autres fins et que la formation de spermidine nécessaire à la synthèse de trypanothione se fasse par la voie débutant par l'ornithine. Bien sûr, ces déductions, pour

être plus crédibles, nécessiteraient le dosage des différents composants des différentes voies métaboliques dans lesquelles est impliquée la SAM.

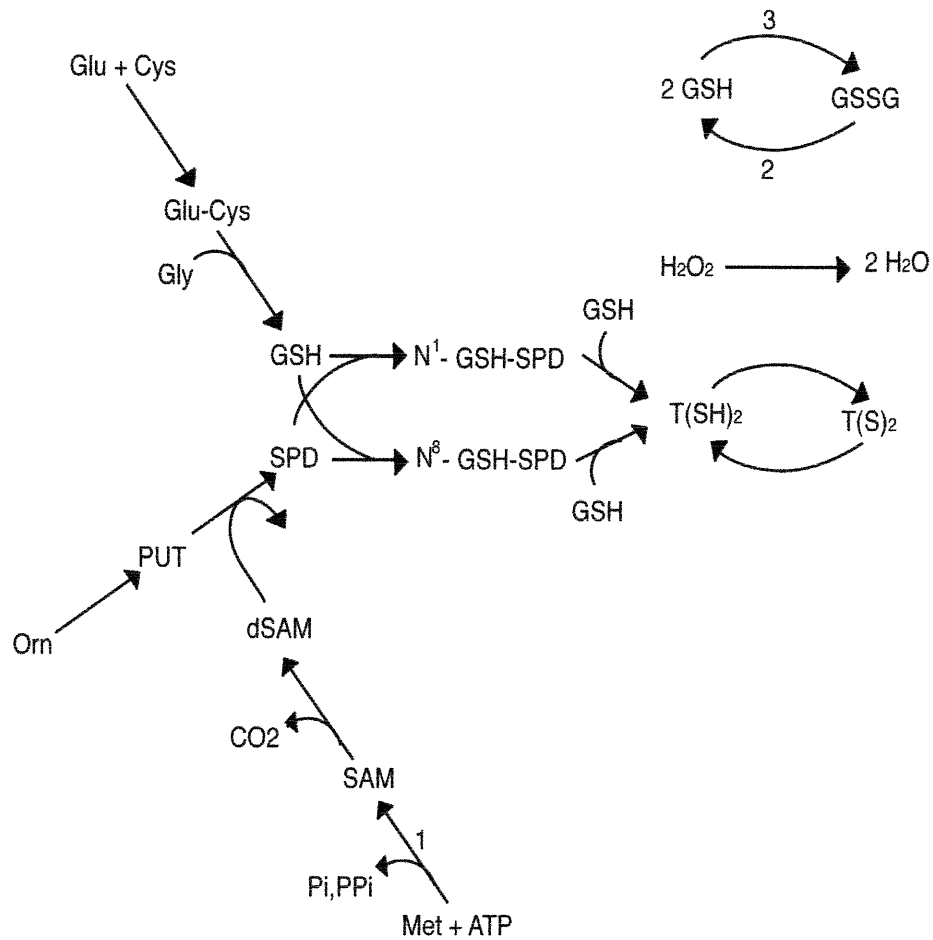


Figure 19. Métabolisme du trypanothione. Abréviations: PUT, putrescine; SPD, spermidine; GSH-SPD, glutathionyl-spermidine; SAM, S-adenosylmethionine; dSAM, decarboxylated S-adenosylmethionine; MTA, methylthioadenosine; P_i, inorganic pyrophosphate T(SH)₂, dihydrotrypanothione; 1, S-adenosylmethionine synthetase; 2, Glutathione reductase; 3, Glutathione peroxidase

18.4 EF-2

EF-2 quant à lui, catalyse la translocation du peptidyl-ARNt du site A au site P. Lors de la traduction des codons liés aux ribosomes, la présence de facteurs protéiques est requise, notamment ces deux facteurs d'élongation; l'aminocyl transferase I (facteur d'élongation 1) et l'aminocyl transferase II (facteur d'élongation 2). Les ribosomes participent à plusieurs réactions qui se répètent à chacun des codons traduits et forment une chaîne polypeptidique de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. Pour chacun des codons traduits, un peptidyl-ARNt est lié en premier à un site sur le ribosome, nommé le site P. Ensuite, un aminocyl-ARNt lié à l'acide aminé spécifique du codon suivant se lie au site A du ribosome, où les acides aminés acceptent la chaîne naissante. Le EF-1 est donc responsable de la liaison de l'aminocyl-ARNt sur le ribosome alors que le EF-2 catalyse le transfert du peptidyl-ARNt du site A au site P. Ces facteurs d'élongation sont des membres de la famille des protéines G qui utilisent le GTP dans la liaison des aminocyl-ARNt aux ribosomes et dans la translocation du peptidyl-ARNt du site A au site P sur le ribosome. Le fait que le EF-2 joue un rôle influant essentiel dans l'avancement des cellules à travers leur cycle de croissance et que le EF-2 agit sous le contrôle direct de l'horloge du cycle cellulaire, suggère une régulation probable de ce facteur, au même titre que la régulation par le pH de la phosphorylation du facteur (Gillette *et al.*, 1990), qui le rend incapable de catalyser le processus de translocation (Ryazanov, 1989). Les changements environnementaux auxquels est soumis le parasite

(changements de pH et température) pourraient expliquer l'expression différentielle de ce facteur entre le stade promastigote et amastigote.

18.5 GAPDH

La GAPDH est une autre des molécules que nous avons identifiée comme étant surexprimée chez l'amastigote. Les molécules identifiées chez le parasite et identifiées comme étant absentes ou très différentes de l'hôte sont considérées comme des cibles idéales pour les drogues. C'est pourquoi les enzymes impliquées dans la glycolyse chez les trypanosomatidae sont perçues comme d'excellentes cibles. Pour assurer une inhibition du flux glycolytique dans ces parasites, Bakker et ses collaborateurs (1999) ont identifié chez *T. cruzi* des cibles potentielles pour des drogues contre les trypanosomes en calculant quelle étape requiert le moins d'inhibition. Contrairement aux érythrocytes où plus de 95% d'inhibition de GAPDH n'entraîne aucune conséquence clinique (Shuster et Holzhter, 1995), la GAPDH chez *T. cruzi* se révèle une des cibles les plus prometteuses. Il semble que des drogues inhibant la GAPDH chez les trypanosomes pourraient aussi être utiles puisque l'équipe de Verlinde (Verlinde *et al.*, 1994) ont montré que les drogues inhibant la GAPDH de *T. brucei* inhibaient aussi la GAPDH de *L. mexicana*.

18.6 Protéines inconnues

Finalement, pour ce qui est des protéines qui sont inconnues pour l'instant, soit les protéines #43, 59 et 200, puisqu'aucune homologie n'a été trouvée avec les séquences présentes dans les banques de données génomiques, il sera nécessaire en attendant le séquençage complet de *L. major*, d'obtenir la séquence d'autres peptides par Q-tof de chacune des protéines identifiées pour en faciliter l'analyse. De prime à bord, l'étude de la protéine #200 serait la plus prometteuse. En effet, c'est la seule protéine identifiée jusqu'à présent qui semble être exprimée uniquement chez le stade amastigote.

19 Perspectives

À court terme, il serait intéressant d'observer l'expression des protéines identifiées tout au long de leur différenciation de promastigote en amastigote comme cela a été fait avec la β -tubuline.

À long terme, avec la construction de mutants, on pourrait observer en microscopie le rôle de ces protéines sur la transformation morphologique du parasite. De même, l'étude du patron protéique permettrait de voir les effets possibles de ces protéines sur le niveau d'expression des autres. De même, des essais de viabilité dans les macrophages avec les leishmanies dont les protéines d'intérêt auront été mutées permettrait de déterminer si ce sont des protéines de virulence. L'impact de ces protéines sur la biogenèse des phagolysosomes de la cellule hôte serait aussi important à déterminer.

Comme il a déjà été fait au laboratoire avec des leishmanies LPG⁻ (Dermine *et al.*, 2000), l'étude des effets de ces protéines sur la biogenèse des phagolysosomes pourrait être réalisée en microscopie électronique avec des anticorps contre ces peptides. Cet outil nous permettrait aussi de les localiser dans la cellule.

Pour les protéines dont les essais doivent être poursuivis à cause des limites de la technique expliquées en 17.2, l'utilisation de bandes dont le gradient de pH est plus restreint devrait être réalisé pour une meilleure séparation des protéines selon leur point isoélectrique. Plus le gradient de pH est restreint pour un gel de même dimension, plus les protéines visualisées seront séparées les unes des autres dans la première dimension. En même temps, la fabrication de gels dont le pourcentage d'acrylamide serait variable pourrait permettre de mieux isoler ces protéines des autres. De plus, l'immunobuvardage avec anticorps en SDS-PAGE devrait permettre de déterminer si la protéine à l'étude est bel et bien exprimée différemment entre les promastigotes et les amastigotes.

Globalement, à long terme, l'identification des protéines déjà observées comme étant exprimées différemment (figures 10 et 11), mais qui n'ont pas encore été identifiées devrait être fait par spectrométrie de masse. De même, l'identification de toutes les protéines exprimées différemment (autant les sur-exprimées que les sous-exprimées) tout au long du processus de différenciation devrait être poursuivie. Ces expériences devraient aussi être réalisées en utilisant d'autres paramètres comme des

bandelettes de gel avec un gradient de pH différent, par exemple de pH 5-9 et des gels dont le pourcentage d'acrylamide diffère. De même, l'étude protéomique des différents compartiments de *L. donovani* pourrait être réalisée (Celis, 1998). En plus, l'identification d'autres protéines serait possible puisqu'une plus grande quantité de protéines pour chacun des compartiments pourraient être analysée. De la même façon, l'analyse des protéines membranaires procurerait de l'information supplémentaire. Cela devrait permettre l'étude systématique d'une grande partie des protéines requises par le parasite pour se différencier en amastigote et survivre à l'intérieur du phagolysosome. Ensuite, les différents mutants construits permettraient d'étudier la fonction de ces protéines. On pourrait analyser l'importance de ces protéines pour la transformation morphologique (en microscopie) et la survie du parasite à l'intérieur du macrophage (par des essais de survie). L'étude protéomique de ces leishmanies mutées permettrait de voir l'implication de ces protéines sur le niveau d'expression d'autres protéines. L'interaction des leishmanies mutées avec les macrophages permettrait d'élucider possiblement d'autres acteurs impliqués dans la biogenèse des phagolysosomes. Parallèlement, toutes les expériences suggérées pourraient être réalisées ultimement sur les leishmanies isolées de phagosomes (Courret *et al.*, 2001). En comparant les schèmes protéiques entre les leishmanies qui se différencient dans les macrophages avec ceux qui se sont différenciés *in vitro*, on pourrait

déterminer quelles sont les protéines dont l'expression est modulée par les changements de température et de pH.

L'approche protéomique mise au point pour caractériser les protéines synthétisées par *L. donovani* durant sa différenciation *in vitro* permettra d'identifier beaucoup de protéines, dont plusieurs inconnues. Déjà, près de la moitié des protéines identifiées n'ont aucune homologie avec les séquences présentes dans les banques de données génomiques. Ce système devrait donc permettre la découverte de nouveaux mécanismes de défenses ou des mécanismes analogues à d'autres présents chez différentes espèces pathogènes. Par exemple, chez les bactéries qui sont des pathogènes des animaux, le système de sécrétion de type III leur permet d'injecter des protéines à travers les membranes (plasmiques ou vacuolaires) de la cellule hôte. La majorité de ces protéines agissent sur le cytosquelette et la réponse immunitaire (revue dans Cornelis et Van Gijsegem, 2000). Ainsi, ce système contribue à l'entrée de *Salmonella ssp* dans les cellules par la phagocytose. Contrairement, chez *Yersinia spp* (Rosqvist *et al.*, 1990), le système permet de résister à la phagocytose. De même, *Yersinia spp* diminue la réponse inflammatoire de l'hôte (Cornelis et Van Gijsegem, 2000), alors que *Shigella spp* induit une réponse inflammatoire majeure à l'épithélium intestinal (revue dans Van Nhieu *et al.*, 1997). De plus, certaines de ces protéines effectrices sont régulées en fonction de paramètres environnementaux comme la température et le pH. En effet, l'expression des protéines de sécrétion de *Yersinia* a lieu à 37°C (température du sang de son hôte) (Ernst, 2000).

Chez *Pseudomonas spp*, la sécrétion de certaines protéines effectrices est dépendante du pH et de la température (Van Dijk *et al.*, 1999). À cause des similarités avec le métabolisme des leishmanies (modulation de la réponse immunitaire de la cellule hôte, régulation de gènes en fonction de la température et du pH ...), on peut penser que des protéines faisant partie d'un système similaire au système de sécrétion de type III soient présentes chez les leishmanies.

BIBLIOGRAPHIE

Adhuna, A., Saltora, P. et Bhatnager R. (2000). Nitric oxide induced expression of stress proteins in virulent and avirulent promastigotes of *Leishmania donovani*. *Immunol Lett.* **71(3)**: 171-176.

Alexander, J. et Vickerman, K. (1975). Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *J Protozool* **22(4)**: 502-508.

Alexander, J., Satoskar, A.R. et Russell G. (1999). *Leishmania* species : models of intracellular parasitism *J Cell Sci.* **112**: 2993-3002.

Anderson, L. et Seilhamer, J. (1997). A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis.* **18(3-4)**: 533-537.

Antoine, J.C., Prina, E., Jouanne, C., Bongrand, P. (1990). Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect and Immun.* **58(3)**: 779-787.

Antoine, J.C., Prina, E., Lang, T. et Courret, N. (1998). The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol* **6(10)**: 392-401.

Ashburner, M., Bonner, J.J. (1979). The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell.* **17(2)**: 241-254.

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

Baeuerle, P.A. et Henkel, T. (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* **12**:141-179.

Bakker, B.M., Westerhoff, H.V. et Michels, P.A. (1995). Regulation and control of compartmentalized glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *J Bioenerg Biomembr.* **27(5)**: 513-525.

Bakker, B.M., Michels, P.A., Opperdoes, F.R. and Westerhoff, H.V. (1997). Glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei* can be understood in terms of the kinetics of the glycolytic enzymes. *J Biol Chem.* **272(6)**:3207-3215

- Bakker, B.M., Michels, P.A., Opperdoes, F.R. et Westerhoff, H.V. (1999). What controls glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*? *J Biol Chem.* **274(21)**: 14551-14559.
- Barrett, M.P., Mottram, J.C., Coombs, G.H. (1999). Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmanias. *Trends in Microbiology* **7(2)**: 82-88.
- Bates, P.A., Cobertson, C.D., Tetley, L. et Coombs, G.H. (1992). Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology* **105**: 193-202.
- Bates, P. (1993). Axenic culture of *Leishmania* amastigotes. *Parasitol Today* **9**:143-146.
- Bates, P.A. (1994). Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology* **108**; 1-9.
- Berman, J.D., Waddell, D, Hanson, B.D. (1985). Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother.* **27(6)**: 916-920.
- Bhaumik, M. et Das S, Adhya, S. (1991). Evidence for translational control of b-tubulin synthesis during differentiation of *L. donovani*. *Parasitology.* **103(Pt 2)**: 197-205.
- Blackwell, J.M., Ezekowitz, R.A., Roberts, M.B., Channon, J.Y., Sim, R.B. et Gordon, S. (1985). Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *J Exp Med* **162(1)**: 324-331.
- Blocker, A., Severin, F.F., Burkhardt, J.K., Bingham, J.B., Yu, H., Olivo, J.C., Schroer, T.A., Hyman, A.A. et Griffiths, G. (1997). Molecular requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules. *J Cell Biol* **137(1)**:113-129.
- Borchardt, R.T., Creveling, C.R. and Ueland P.M. (1986). Proceedings of a Symposium on Biological methylation and drug design, Norway. Humana Press, Clifton, New Jersey.
- Bordier, C. (1987). The promastigote surface protease of *Leishmania*. *Parasitology Today.* **3**: 151.
- Braig, K., Simon, M., Furuya, F., Hainfeld, J.F. et Horwich, A.L. (1993). A polypeptide bound by the chaperonin groEL is localized within a central cavity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90(9)**: 3978-3982.

Brittingham, A., Morrison, C.J., McMaster, W.R., McGwire, B.S., Chang, K.P., Mosser, D.M. (1995). Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol.* **155(6)**: 3102-3111.

Brittingham, A. et Mosser, D.M. (1996). Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol Today* **12**: 444- 447.

Britto, C., Ravel, C., Bastien, P., Blaineau, C., Pages, M., Dedet, J.P. et Wincker, P. (1998). Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene* **222(1)**:107-117.

Buchmeier, N.A. et Heffron, F. (1991). Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **59(7)**: 2232-2238.

Celis E. Julio. (1998). *Cell Biology A laboratory handbook* Academic Press Denmark.

Chang, K.P. et Dwyer, D.M. (1976). Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. *Science.* **193(4254)**: 678-80.

Chang K.-P. et Bray R.S. (1985). *Human Para diseases v.1 Leishmaniasis.* Elsevier Amsterdam, New York, Oxford.

Chan, J., Fujiwara, T., Brennan, P., McNeil, M., Turco, S.J., Sibille, J.C., Snapper, M., Aisen, P. et Bloom, B.R. (1989). Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86(7)**: 2453-2457.

Charest H. et Matlashewski G. (1994). Developmental gene expression in *Leishmania donovani* : differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. *Mol Cell Biol.* **14(5)** : 2975-2984.

Claus, V., Jahraus, A., Tjelle, T., Berg, T., Kirschke, H., Faulstich, H. et Griffiths, G. (1998). Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *J Biol Chem.* **273** : 9842-9851.

Cooper, A., Rosen, H. et Blackwell, J.M. (1988). Monoclonal antibodies that recognize distinct epitopes of the macrophage type three complement receptor differ in their ability to inhibit binding of *Leishmania* promastigotes harvested at different phases of their growth cycle. *Immunology.* **65(4)**: 511-514.

- Cornelis G.R. et Van Gijsegem F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **54** : 735-774.
- Courret, N., Frehel C., Prina, E., Lang, T. et Antoine J.C. (2001). Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. *Parasitology.* **122(Pt 3)**: 263-279.
- Dermine, J.F., Scianimanico, S., Prive, C., Descoteaux, A. et Desjardins, M. (2000). *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol.* **2(2)**:115-126.
- Desjardins, M., Celis, J.E., Van Meer, G., Dieplinger, H., Jahraus, A., Griffiths, G. et Huber, L.A. (1994). Molecular characterization of phagosomes. *J Biol Chem* **269(51)**: 32194-32200.
- Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G. et Griffiths, G. (1994). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* **124(5)**: 677-688.
- Desjardins, M., Nzala, N.N., Corsini, R. et Rondeau, C. (1997). Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J Cell Sci* **110(Pt 18)**: 2303-2314.
- Desjardins, M. (1994). Biogenesis of phagolysosomes: the "kiss and run" hypothesis. *Trends Cell Biol.* **5**: 183-186.
- Dinarello, C.A. (1994). Blocking interleukin-1 receptors. *Int J Clin Lab Res* (1994). **24(2)**: 61-79.
- Davidson, R.N. (1999). Visceral Leishmaniasis in Clinical Practice *Biology of the Parasite.* *J Infect* **30**: 112-116.
- Donelson J.E., Gardner M.J., El-Sayed, N.M. (1999). More surprises from *Kinetoplastida*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96(6)**: 2579-2581.
- Doran, T.I. et Herman, R. (1981). Characterization of populations of promastigotes of *Leishmania donovani*. *J Protozool.* **28(3)**: 345-350.
- Doyle, P.S., Engel, J.C., Pimenta, P.F., da Silva P.P., et Dwyer, D.M. (1991). *Leishmania donovani*: long-term culture of axenic amastigotes at 37°C *Exp Parasitol.* **73**: 326-334.

Duclos, S. et Desjardins, M. (2000). Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. *Cell Microbiol* **2(5)**: 365-377.

Ephros M, Waldman E. et Zilberstein D. (1997). Pentostam induces resistance to antimony and the preservative chlorocresol in *Leishmania donovani* promastigotes and axenically grown amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* **41**:1064-1068.

Ernst J.D. (2000). Bacterial inhibition of phagocytosis. *Cellular microbiology.* **2(5)** : 379-386.

Fairlamb A.H. (1989). Novel biochemical pathways in parasitic protozoa. *Parasitology.* **99** suppl:S93-112.

Farago, A. et Nishizuka, Y. (1990). Protein kinase C in transmembrane signalling. *FEBS Lett.* **268**: 350-354.

Farr, G.W., Scharl, E.C., Schumacher, R.J., Sondek, S. et Horwich, A.L. (1997). Chaperonin-mediated folding in the eukaryotic cytosol proceeds through rounds of release of native and nonnative forms. *Cell.* **89(6)**: 927-937.

Fenton W.A., Weissman J.S., Horwich A.L. (1996). Putting a lid on protein folding: structure and function of the co-chaperonin, GroES. *Chem Biol.* **3(3)**:157-161.

Ferguson, M.A., Haldar, K., Cross, G.A. (1985). *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein has a sn-1,2-dimyristyl glycerol membrane anchor at its COOH terminus. *J Biol Chem.* **260(8)**: 4963-4968.

Fong, D. et Chang, K.P. (1981). Tubulin biosynthesis in the developmental cycle of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana*: changes during differentiation of motile and nonmotile stages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **78(12)**: 7624-7628.

Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. et Cossart, P. (1991). Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65(7)**: 1127-1141.

Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J.F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C. et Desjardins, M. (2001). The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* **152(1)**: 165-180.

Gething MJ, Sambrook J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature.* **355(6355)**: 33-45.

- Ghedini, E., Zhang, W.W., Charest, H., Sundar, S., Kenney, R.T. et Matlashewski, G. (1997). Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* **4(5)**: 530-535.
- Giannini, M.S. (1974). Effects of promastigote growth phase, frequency of subculture, and host age on promastigote-initiated infections with *Leishmania donovani* in the golden hamster. *J Protozool.* **21(4)**: 521-527.
- Gillette, R., Gillette, M., Lipeski, L. et Connor, J. (1990). pH-sensitive, Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphorylation of unique protein in molluscan nervous system. *Biochem Biophys Acta.* **1036(3)**: 207-212.
- Giorgione J.R, Turco, S.J. et Epand, R.M. (1996). Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93(21)**: 11634-11639.
- Glaser, T.A., Baatz, J.E., Kreishman, G.P. et Mukkada, A.J. (1988). pH homeostasis in *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85(20)**: 7602-7606.
- Gooley A.A. et Packer N.H. (1997). The Importance of Protein Co- and Post-Translational Modifications in Proteome Projects. *Proteome Research: new Frontiers in Functional Genomics.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Greenberg, S., Chang, P. et Silverstein, S.C. (1993). Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J Exp Med* **177(2)**: 529-534.
- Greenberg, S. et Silverstein, S.C. (1993). *Fundamental Immunology Third Edition.* Edited by Paul WE Raven Press Ltd., New York. Phagocytosis chapt 27.
- Hall, L.R. et Titus, R.G. (1995). Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J Immunol.* **155(7)**: 3501-3506.
- Handman, E. et Goding, J.W. (1985). The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *EMBO J* **4(2)**: 329-336.
- Handman, E. (1999). Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol.* **44**:1-39.
- Hartl, F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature.* **381(6583)**: 571-579

- Haynes, P.A., Gygi, S.P., Figeys, D. et Aebersold, R. (1998). Proteome analysis: biological assay or data archive? *Electrophoresis*. **19(11)**: 1862-1871.
- Henderson, G.B., Fairlamb, A.H. et Cerami, A. (1987). Trypanothione dependent peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. **24(1)**: 39-45.
- Hommel, M. *J Infect* (1999). Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. **39(2)**:101-111.
- Houslay, M.D. (1991). Crosstalk: a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *Eur.J.Biochem*. **195**: 9-27.
- Howard, M.K., Sayers, G. et Miles, M.A. (1987). *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation in vitro, lectin agglutination, complement resistance, and infectivity. *Exp Parasitol*. **64(2)**: 147-156.
- Hubel, A., Krobitsch, S., Horauf, A. et Clos, J. (1997). *Leishmania major* Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Mol Cell Biol*. **17(10)**: 5987-5995.
- Jackson, G.S., Staniforth, R.A., Halsall, D.J., Atkinson, T., Holbrook, J.J., Clarke, A.R. et Burston, S.G. (1993). Binding and hydrolysis of nucleotides in the chaperonin catalytic cycle: implications for the mechanism of assisted protein folding. *Biochemistry*. **32(10)**: 2554-2563.
- Jahraus, A., Storrie, B., Griffiths, G. et Desjardins, M. (1994). Evidence for retrograde traffic between terminal lysosomes and the prelysosomal/late endosome compartment. *J Cell Sci*. **107** : 145-157.
- Joshi, M., Dwyer, D.M. et Nakhasi, H.L. (1993). Cloning and characterization of differentially expressed genes from in vitro-grown "amastigotes" of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*. **58**: 345-54.
- Kawalleck, P., Plesch, G., Hahlbrock, K. et Somssich, I.E. (1992). Induction by Fungal Elicitor of S-Adenosyl-L-Methionine Synthetase and S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase mRNAs in Cultured Cells and Leaves of *Petroselinum crispum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89(10)**: 4713-4717.
- Kredich N.M., Kotb, M., German, D.C. et Bloch C.A. (1986). Regulation of S-Adenosylmethionine synthesis in human lymphocytes: 203-214.

- Krobitsch, S., Brandau, S., Hoyer, C., Schmetz, C., Hubel, A. et Clos J. (1998). Leishmania donovani heat shock protein 100. Characterization and function in amastigote stage differentiation. *J Biol Chem.* **273(11)**:6488-6494.
- Laemmli, U.K. (1970). Clivage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lainson, R., Shaw, J.J., Silveira, F.T., Braga, R.R. (1987). American visceral leishmaniasis: on the origin of Leishmania (*Leishmania*) chagasi. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **81(3)**:517.
- Landfear, S.M. et Wirth, D.F. (1984). Control of tubulin gene expression in the parasitic protozoan *Leishmania enriettii*. *Nature.* **309(5970)**: 716-717.
- Li, Y.P., Curley, G., Lopez, M., Chavez, M., Glew, R., Aragon, A., Kumar, H. et Baca, O.G. (1996). Protein-tyrosine phosphatase activity of *Coxiella burnetii* that inhibits human neutrophils. *Acta Virol* **40(5-6)**: 263-272.
- Lima, H.C. et Titus, R.G. (1996). Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect Immun.* **64(12)**: 5442-5445.
- Maegraith, B.G. (1980). Adams and Maegraith: *Clinical Tropical Diseases*. 7th edn. Blackwell Scientific Publications: Oxford : 174-195.
- Mallinson, D.J. et Coombs, G.H. Biochemical characteristics of the metacyclic forms of *Leishmania major* and *L. mexicana mexicana*. *Parasitology.* **98(Pt 1)**: 7-15.
- Mallinson, D.J. et Coombs, G.H. (1989). Interaction of leishmania metacyclics with macrophages. *Int J Parasitol.* **19(6)**: 647-656.
- Manson-Bahr, P.E.C., Southgate, B.A. et Harvey, A.E.C. (1963). Development of kala-azar in man after inoculation with a leishmania from a Kenya sandfly. *British Medical Journal* **1**: 1208-1210.
- Manson-Bahr, P.H. (1966). *Manson's Tropical Diseases*. 16th edn. Baillière, Tindall and Cassell: London : 107-143.
- Mandell, G.L. (1995). Cytokines, phagocytes, and pentoxifylline. *J Cardiovasc Pharmacol* **25 Suppl 2**: S20-22.
- Mayhew, M., da Silva, A.C., Martin, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. et Hartl, F.U. (1996). Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature.* **379(6564)**:420-426.

McConville, M.J. et Blackwell, J.M. (1991). Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani* : Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J Biol Chem.* **266(23)**:15170-15179.

McConville, M.J. et Ferguson, M.A. (1993). The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J.* **294 (Pt 2)**: 305-324.

McConville, M.J. et Blackwell, J.M. (1991). Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J Biol Chem* **266(23)**: 15170-15179.

McConville, M.J., Turco, S.J., Ferguson, M.A. et Sacks, D.L. (1992). Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J.* **11**: 3593-3600.

Meister, A. et Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem.* **52**: 711-760.

Mengaud, J., Dramsi, S., Gouin, E., Vazquez-Boland, J.A., Milon, G. et Cossart, P. (1991). Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol Microbiol* **5(9)**: 2273-2283.

Mengeling B.J., Zilberstein D. et Turco S.J. (1997). Biosynthesis of *Leishmania* lipophosphoglycan: solubilization and partial characterization of the initiating mannosylphosphoryltransferase. *Glycobiology.* **7**: 847-853.

Michels, P.A., Hannaert, V. (1994). The evolution of kinetoplastid glycosomes. *J Bioenerg Biomembr.* **26(2)**: 213-219.

Miller, J.S. (1988). Effects of temperature elevation on mRNA and protein synthesis in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol.* **30(2)**: 175-184.

Molyneux, D.H., Killick-Kendrick, R. et Ashford, R.W. (1975). *Leishmania* in phlebotomid sandflies. III. The ultrastructure of *Leishmania mexicana amazonensis* in the midgut and pharynx of *Lutzomyia longipalpis*. *Proc. R. Soc. London B.* **190**: 341-357.

Morimoto, R.I., Tissières, A. et Georgopoulos, C. (1994). The biology of Heat-Shock proteins and molecular chaperones, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

McConville M.J. et Blackwell, J.M. (1991). Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* **266**: 15170-15179.

Medina-Acosta, E., Karess, R.E., Schwartz, H. et Russell, D.G. (1989). The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. *Mol Biochem Parasitol.* **37(2)**: 263-273.

Michalak, M., Corbett, E.F., Mesaeli, N., Nakamura, K. et Opas, M. (1999). Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J.* **344 (Pt 2)**: 281-292.

Moncada, S. et Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* **329(27)**: 2002-2012.

Moore, K.J. et Matlashewski, G. (1994). Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol.* **152(6)**: 2930-2937.

Mosser D.M. (1994). Receptors on phagocytic cells involved in microbial recognition. *Immunol Ser.* **60**:99-114.

Murray, H.W. (1981). Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. *J Exp Med.* **153(5)**: 1302-1315.

Murray, H.W. (1981). Interaction of *Leishmania* with a macrophage cell line. Correlation between intracellular killing and the generation of oxygen intermediates. *J Exp Med.* **153(6)**: 1690-1695.

Murray, H.W. (1982). Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes, *J Immunol.* **129(1)**: 351-357.

Miller R.A. et Britigan B.E. (1997). Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev.* **10(1)**: 1-18.

Muller, W.A., Steinman, R.M. et Cohn, Z.A. (1980). The membrane proteins of the vacuolar system. II. Bidirectional flow between secondary lysosomes and plasma membrane. *J Cell Biol.* **86(1)**: 304-314.

Myler, P.J., Sisk, E., McDonagh, P.D., Martinez-Calvillo, S., Schnauffer, A., Sunkin, S.M., Yan, S., Madhubala, R., Ivens, A., Stuart, K. (2000). Genomic organization and gene function in *Leishmania*. *Biochem Soc Trans.* **28(5)**: 527-531.

- Nathan, C. et Xie, Q.W. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. **78(6)**: 915-918.
- Napier, L.E. (1946). *The principles and Practice of Tropical Medicine*. The Macmillan Company:New York :134-177.
- Nielsen E., Severin F., Backer J.M., Hyman AA., Zerial M. (1999). *Nat Cell Biol*. 1(6) : E145-7.
- Nozais J.P., Datry A., Martin D. (1999). *Traité de parasitologie médicale*. Éditions prodel. Paris : 213-240.
- Oh, Y.K. et Swanson, J. (1996). Different fates of phagocytosed particles after delivery into macrophage lysosomes. *J Cell Biol*. **132** : 585-593.
- Opperdoes, F.R. (1987). Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annu Rev Microbiol*. **41**: 127-151.
- Overath, P., Stierhof, Y.D. et Wiese, M. (1997). Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites-tumultuous traffic in a pocket. *Trends Cell Biol*. **7**: 27-33.
- Pan, A.A. (1984). *Leishmania mexicana*: serial cultivation of intracellular stages in a cell free medium. *Exp Parasitol*. **58**: 72-80.
- Pan, A.A. et McMahon-Pratt, D. (1988). Monoclonal antibodies specific for the amastigote stage of *Leishmania pifanoi*.I. Characterization of antigens associated with stage and species-specific determinants. *J Immunol*. **140(7)**: 2406-2414.
- Pearson, R.D., Harcus, J.L., Symes, P.H., Romito, R. et Donowitz, G.R. (1982). Failure of the phagocytic oxidative response to protect human monocyte-derived macrophages from infection by *Leishmania donovani*. *J Immunol*. **129(3)**: 1282-1286.
- Piedrafita, D., Proudfoot, L., Nikolaev, A.V., Xu, D., Sands, W., Feng, G.J., Thomas, E., Brewer, J., Ferguson, M.A., Alexander, J. et Liew, F.Y. (1999). Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania phosphoglycans*. *Eur J Immunol* **29(1)**: 235-244.
- Pimenta, P.F., da Silva, R.P., Sacks, D.L. et da Silva, P.P. (1989). Cell surface nanoanatomy of *Leishmania major* as revealed by fracture-flip. A surface meshwork of 44 nm fusiform filaments identifies infective developmental stage promastigotes. *Eur J Cell Biol*. **48(2)**: 180-190.

- Pimenta, P.F., Turco, S.J., McConville, M.J., Lawyer, P.G., Perkins, P.V., Sacks, D.L. (1992). Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* **256(5065)**: 1812-1815.
- Pitt, A., Mayorga, L.S., Stahl, P.D. et Schwartz A.L. (1992). Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J Clin Invest.* **90** : 1978-1983.
- Probst, P., Stromberg, E., Ghalib, H.W., Mozel, M., Badaro, R., Reed, S.G. et Webb, J.R. (2001). Identification and characterization of T cell-stimulating antigens from *Leishmania* by CD4 T cell expression cloning. *J Immunol.* **166(1)**: 498-505.
- Proudfoot, L., O'Donnell, C.A. et Liew, F.Y. (1995). Glycoinositolphospholipids of *Leishmania* major inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol.* **25(3)**: 745-750.
- Proudfoot, L., Nikolaev, A.V., Feng, G.J., Wei, W.Q., Ferguson, M.A., Brimacombe, J.S. et Liew, F.Y. (1996). Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93(20)**: 10984-10999.
- Puentes, S.M., Dwyer, D.M., Bates, P.A. et Joiner, K.A. (1989). Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J Immunol* **143(11)**: 3743-3749.
- Puentes, S.M., Da Silva R.P., Sacks, D.L., Hammer C.H. et Joiner K.A. (1990). Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania* major promastigotes is due to release of C5-C9. *J Immunol.* **145(12)**: 4311-4316.
- Rainey, P.M., Spithill, T.W., McMahon-Pratt, D. et Pan A.A. (1991). Biochemical and molecular characterization of *Leishmania pifanoi* amastigotes in continuous axenic culture. *Mol Biochem Parasitol.* **49**: 111-118.
- Rajeev, K.M. (1996). Antioxydant Defense Mechanisms in Parasitic Protozoa. *Critical Reviews in Microbiology.* **22(4)**: 295-314.
- Ralton, J.E. et McConville, M.J. (1998). Delineation of three pathways of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis in *Leishmania mexicana*. Precursors from different pathways are assembled on distinct pools of phosphatidylinositol and undergo fatty acid remodeling. *J Biol Chem.* **273(7)**: 4245-4257.
- Ramachandra, L., Song, R. et Harding, C.V. (1999). Phagosomes are fully competent antigen-processing organelles that mediate the formation of peptide :class II MHC complexes. *J Immunol.* **162** : 3263-3272.

- Rees P.H. et Kager P.A. (1987). The leishmaniasis. Volume II : 584-611.
- Ribeiro, J.M., Vachereau, A., Modi, G.B. et Tesh, R.B. (1989). A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Science*. **243(4888)**: 212-214.
- Rizzi, M., Arici, C., Bonaccorso, C. et Gavazzeni, G. (1988). Visceral leishmaniasis in a patient with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **82(4)**: 565.
- Roseman, A.M., Chen, S., White, H., Braig, K. et Saibil, H.R. (1996). The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL. *Cell*. **87(2)**: 241-251.
- Rosqvist R., Forsberg A., Rimpilainen M., Bergman T. et Wolf-Watz H. (1990). The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol. Microbiol.* **4** : 657-667.
- Russell, D.G. et Talamas-Rohana, P. (1989). *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. *Immunol Today* **10(10)**: 328-333.
- Ryazanov, A.G. et Davydova, E.K. (1989). Mechanism of elongation factor 2 (EF-2) inactivation upon phosphorylation. Phosphorylated EF-2 is unable to catalyze translocation. *FEBS Lett.* **251(1-2)**: 187-190.
- Saar, Y., Ransford, A., Waldman, E., Mazareb, S., Amin-Spector, S., Plumblee, J., Turco, S.J. et Zilberstein, D. (1998). Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol.* **95(1)**: 9-20.
- Sacks, D.L. et Perkins, P.V. (1984). Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*. **223(4643)**: 1417-1419.
- Sacks, D.L., Hieny, S. et Sher, A. (1985). Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J Immunol.* **135(1)**: 564-569.
- Sacks, D.L. et da Silva, R.P. (1987). The generation of infective stage *Leishmania major* promastigotes is associated with the cell-surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. *J Immunol.* **139(9)**: 3099-3106.

Sacks, D.L., Brodin, T.N. et Turco S.J. (1990). Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. *Mol Biochem Parasitol* **42(2)**: 225-233.

Sacks, D.L., Pimenta, P.F., McConville, M.J., Schneider, P. et Turco, S.J. (1995). Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* **181(2)**: 685-697.

Saraiva, E.M., Pimenta, P.F., Brodin, T.N., Rowton, E., Modi, G.B. et Sacks, D.L. (1995). Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology*. **111 (Pt 3)**: 275-287.

Shaw, J.J. (1994). Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **89(3)**: 471-478.

Schlein, Y., Schnur, L.F. et Jacobson, R.L. (1990). Released glycoconjugate of indigenous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **84(3)**:353-355.

Schlein, Y. (1993). *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol Today*. **9**: 255-8.

Schluter, A., Wiesgigl, M., Hoyer, C., Fleischer, S., Klaholz, L., Schmetz, C. et Clos, J. (2000). Expression and subcellular localization of cpn60 protein family members in *Leishmania donovani*. *Biochim Biophys Acta*. **1491(1-3)**: 65-74.

Schuster, R. et Holzhutter, H.G. (1995). Use of mathematical models for predicting the metabolic effect of large-scale enzyme activity alterations. Application to enzyme deficiencies of red blood cells. *Eur J Biochem*. **229(2)**: 403-418.

Scianimanico, S., Desrosiers, M., Dermine, J.F., Meresse, S., Descoteaux, A. et Desjardins, M. (1999). Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell Microbiol*. **1(1)**: 19-32.

Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Shevchenko A, Boucherie H, et Mann M (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:14440-14445.

- Simpson, L. (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 363-382.
- Souza, A.E., Bates, P.A., Coombs, G.H., Mottram, J.C. (1994). Null mutants for the *Imcpa* cysteine proteinase gene in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol.* **63(2)**: 213-220.
- Staniforth, R.A., Burston, S.G., Atkinson, T. et Clarke, A.R. (1994). Affinity of chaperonin-60 for a protein substrate and its modulation by nucleotides and chaperonin-10. *Biochem J.* **300 (Pt 3)**: 651-658.
- St-Denis A, Caouras V, Gervais F, Descoteaux A. (1999). Role of protein kinase C-alpha in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages. *J Immunol.* **163(10)**: 5505-11.
- Stramentinoli, G. (1987). Pharmacological aspects of S-Adenosyl-L-Methionine : Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Am J Med.* **83(5A)**: 35-42.
- Suerbaum, S., Thiberge, J.M., Kansau, I., Ferrero, R.L. et Labigne, A. (1994). *Helicobacter pylori* hspA-hspB heat-shock gene cluster: nucleotide sequence, expression, putative function and immunogenicity. *Mol Microbiol.* **14(5)**: 959-974.
- Telford, S.R. jr. (1995). The kinetoplastid hemoflagellates of reptiles. In: *Parasitic Protozoa*; edition 2, (J.P. Kreier, ed.) San Diego: Academic Press. **Vol.10** : 161-223.
- Titus, R.G. et Ribeiro, J.M. (1988). Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science.* **239(4845)**: 1306-1308.
- Trager, W. (1983). In vitro growth of parasites. In : *methods in Immunology and Immunochemistry* (Guardiola, J., Luzzatto, I and Trger, W., eds). Academic Press, New York **Vol.3** : 321-339.
- Trinchieri, G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* **13**: 251-276.
- Turco, S.J., Sacks, D.L. (1991). Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* **45(1)**: 91-99.

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

Van der Ploeg, L.H, Giannini, S.H. et Cantor, C.R. (1985). Heat Shock Genes : Regulatory Role for Differentiation in Parasitic Protozoa. *Science*. **228(4706)**: 1443-1445.

Van Dijk K, Fouts DE, Rehm AH, Hill AR, Collmer A et Alfano JR. (1999). The Avr (effector) proteins HrmA (HopPsyA) and AvrPto are secreted in culture from *Pseudomonas syringae* pathovars via the Hrp (type III) protein secretion system in a temperature- and pH-sensitive manner. *J Bacteriol*. **181(16)**: 4790-4797.

Vanhamme L., Pays E. (1995). Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev*. **59(2)**: 223-240.

Van Nhieu G.T., BenZeev A., Sansonetti P.J. (1997). Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the *Shigella* IpaA invasin. *EMBO J*. **16** : 2717-2729.

Verlinde, C.L., Callens, M., Van Calenbergh, S., Van Aerschot, A., Herdewijn, P., Hannaert, V., Michels, P.A., Opperdoes, F.R. et Hol, W.G. (1994). Selective inhibition of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by protein structure-based design: toward new drugs for the treatment of sleeping sickness. *J Med Chem*. **37(21)**: 3605-3613.

Weiss, S.J. (1986). Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand Suppl* **548**: 9-37.

Weissman, J.S., Kashi, Y., Fenton, W.A. et Horwich, A.L. (1994). GroEL-mediated protein folding proceeds by multiple rounds of binding and release of nonnative forms. *Cell*. **78(4)**: 693-702.

Weissman, J.S., Hohl, C.M., Kovalenko, O., Kashi, Y., Chen, S., Braig, K., Saibil, H.R., Fenton, W.A. et Horwich, A.L. (1995). Mechanism of GroEL action: productive release of polypeptide from a sequestered position under GroES. *Cell*. **83(4)**: 577-587.

Weissman, J.S., Rye, H.S., Fenton, W.A., Beechem, J.M. et Horwich, A.L. (1996). Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES-mediated protein folding reaction. *Cell*. **84(3)**: 481-490.

WHO. Information on the epidemiology and control of the Leishmaniases by country or territory. P. Desjeux. WHO/LEISH/91.30. Geneva : World Health Organization. 1991.

- WHO. Manual on visceral leishmaniasis control. WHO/LEISH/96.40. Geneva :World Health Organization. 1996.
- Williams K.L. et Hochstrasser D.S. (1997). Introduction to the Proteome. Proteome Research: new Frontiers in Functional Genomics. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Wilson, M.E. et Pearson, R.D. (1988). Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* **56(2)**: 363-369.
- Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Jauffret, Y., Dedet, J.P. et Bastien P. (1996) The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* **24(9)**: 1688-1694.
- Wright, M.I. (1959). Kala-azar of unusual duration, associated with a gammaglobulinaemia. *British Medical Journal* **1**: 1218-1223.
- Wright, S.D. et Silverstein, S.C. (1983). Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J Exp Med.* **158(6)**: 2016-2023.
- Xu, Z., Horwich, A.L. et Sigler, P.B. (1997). The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature.* **388(6644)**: 741-750.
- Yamamoto, K. et Johnston, R.B. Jr. (1984). Dissociation of phagocytosis from stimulation of the oxidative metabolic burst in macrophages. *J Exp Med.* **159(2)**: 405-416.
- Yifrach, O. et Horovitz, A. (1996). Allosteric control by ATP of non-folded protein binding to GroEL. *J Mol Biol.* **255(3)**: 356-361.
- Zhang, J.X., Braakman, I., Matlack, K.E. et Helenius, A. (1997). Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations. *Mol Biol Cell.* **8(10)**:1943-1954.
- Zhang, W.W. et Matlashewski, G. (1997). Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94(16)**: 8807-8811.
- Zilberstein, D. et Shapira, M. (1994). The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol.* **48**: 449-470.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Michel Desjardins pour m'avoir accordé sa confiance et permis de réaliser ce travail dans son laboratoire, Christiane Rondeau pour tous ses conseils techniques qui ont grandement facilité mon travail et les autres membres de l'équipe; Jean-François Dermine et Sophie Duclos pour le partage d'idées.

Je remercie tout particulièrement ma mère pour tous ses encouragements et son soutien moral. Jean-Frédéric Flandin pour tous ses bons conseils, la relecture critique, la correction du français de ce mémoire et ses soirées à alterner entre le 6^e et le 9^e. Sans oublier Lucie Chapdelaine avec qui j'ai multiplié mes temps de pauses sans regrets pour continuer nos discussions animées : VIVE Agathe, Scarabé, Crépinette et Microbe qui m'aident à me situer face à la science et la vie en général !!!!!. Je tiens à les remercier grandement pour ne pas avoir à remercier des animaux qui auraient servi à mes recherches, si ce n'est certains anticorps que j'ai dû utiliser, mais lesquels j'aurais vraiment aimé pouvoir éviter. Une pensée particulière à toutes les leishmanies utilisées qui m'ont aidé à comprendre bien des principes tout en posant plein d'énigmes, me faisant planer des soirées entières et pour longtemps encore, c'est certain.