

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 862 313**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **03 13555**

⑤1 Int Cl⁷ : C 12 N 15/79, C 12 N 15/30, 1/11 // A 61 K 39/008

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 19.11.03.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 20.05.05 Bulletin 05/20.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT DE RECHERCHE POUR
LE DEVELOPPEMENT I.R.D. Etablissement public —
FR.

⑦2 Inventeur(s) : LEMESRE JEAN LOUP, CAVALEYRA
MIREILLE, SERENO DENIS et HOLZMULLER PHI-
LIPPE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET ARMENGAUD AINE.

⑤4 NOUVEAUX MOYENS POUR LA PREVENTION DES LEISHMANIOSES.

⑤7 L'invention a pour objet des constructions d'acides nu-
cléiques, caractérisées en ce qu'elles comportent des aci-
des nucléiques isolés en position sens, capables de coder
pour une protéine immunogène de formes promastigotes ou
de formes amastigotes de Leishmania, lesdits acides nu-
cléiques répondant à l'une des séquences SEQ ID N°1,
SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5.

Application pour la surexpression de gènes de Leishma-
nia codant pour un antigène d'excrétion/sécrétion.

FR 2 862 313 - A1



Nouveaux moyens pour la prévention des *leishmanioses*

5 L'invention a pour objet de nouveaux moyens pour la prévention des *leishmanioses* chez l'animal et chez l'homme.

Elle vise en particulier des molécules d'acides nucléiques codant pour des facteurs de virulence ou de pathogénicité chez *Leishmania* et leur utilisation pour produire de tels facteurs afin d'élaborer des compositions vaccinales contre les *leishmanioses*.

10 Les *leishmanioses* représentent l'une des six maladies parasitaires majeures et sont considérées, à ce titre, comme prioritaires par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S). Les leishmanies existent sous la forme promastigote extracellulaire, à l'intérieur du tube digestif de l'insecte vecteur (le phlébotome), et sous la forme amastigote intracellulaire, chez l'hôte mammifère. Plusieurs molécules, dont les
15 lypophosphoglycanes (LPG) ou une métalloprotéase appelée gp63, semblent jouer un rôle important dans le pouvoir infectieux et la pathogénicité du parasite. Plus récemment, une famille de glycoprotéines appelées antigènes de surface de promastigotes, PSA (pour "Promastigote Surface Antigens"), a suscité un intérêt nouveau. Ces PSA sont caractérisées par la présence de motifs répétés riches en
20 leucine pouvant intervenir dans les interactions de type protéine/protéine et confèrent une immunité protectrice à médiation cellulaire de type Th 1 chez la souris. Chez des organismes, tels que les bactéries ou les plantes, il est apparu que les PSA étaient impliquées dans des fonctions comme l'adhésion cellulaire, la résistance aux pathogènes et la transduction de signaux.

25 Cependant, aucun rôle biologique n'a été décrit, ni suggéré, chez *Leishmania*.

Ce rôle a pu être étudié par les inventeurs grâce à la technique qu'ils détiennent pour cultiver des promastigotes et des amastigotes de *Leishmania* dans des conditions asériques et axéniques, avec un milieu totalement défini, c-à-d dont les constituants sont tous identifiés, et qui fait l'objet du brevet FR 93 05 779 du 13 mai 1993 au nom
30 de l'IRD (ex. ORSTOM). La maîtrise de ce procédé leur permet de disposer de formes parasitaires dépourvues des contaminants apportés jusqu'alors par les

milieux de culture, et de déterminants antigéniques sous une forme hautement purifiée.

Dans ledit brevet FR de la Demanderesse, on a déjà décrit l'isolement et l'identification d'une PSA excrétée/secrétée (antigène d'excrétion/secrétion ou AES en abrégé) de 38 kDa et de 45 kDa dans le surnageant de culture de *L. amazoniensis*.

5 Les inventeurs ont à présent isolé et cloné l'ADNc codant pour cette protéine et procédé à l'évaluation de son rôle dans la biologie du parasite en mettant au point une stratégie de transgénèse additionnelle. Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'implication de cette PSA en tant que facteur de virulence et/ou de pathogénicité et d'élaborer des constructions permettant de surexprimer le gène de *Leishmania* codant pour cette PSA, ce qui permet de développer des moyens pour l'obtention de compositions vaccinales contre les *leishmanioses*.

10 L'invention a donc pour but de fournir des séquences d'acides nucléiques capables de coder pour des PSA de formes promastigotes et de formes amastigotes de *Leishmania*, constituant des facteurs de virulence et/ou de pathogénicité.

Elle vise tout particulièrement à fournir des vecteurs de surexpression de ces PSA, ainsi que des parasites génétiquement modifiés.

L'invention vise en outre les surnageants des milieux de culture des PSA obtenues, ainsi que les PSA isolées, purifiées, et la mise à profit de leurs propriétés pour élaborer des compositions vaccinales contre les *leishmanioses*.

20 Les séquences d'acides nucléiques de l'invention correspondent à des acides nucléiques isolés capables de coder pour une PSA de formes promastigotes ou de formes amastigotes de *Leishmania*, lesdits acides nucléiques répondant à l'une des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5.

25 Les séquences d'acides nucléiques de l'invention sont plus spécialement des séquences de clones d'ADNc appartenant à une famille répondant aux caractéristiques illustrées par la figure 2 et comprenant en particulier un site de restriction *SalI* et deux sites de restriction *HindIII*, avec un codon stop situé en aval du premier site *HindIII*.

L'invention vise en particulier les clones d'ADNc de ladite famille comportant un site de restriction *EcoRV* et/ou *PstI* entre les deux sites *Sall* et *HindIII*, ou de part et d'autre du site *Sall*.

5 L'invention vise également les protéines immunogènes isolées, caractérisées en ce qu'elles présentent une séquence telle que codée par les acides nucléiques définis ci-dessus.

Ces protéines appartiennent à la famille dite des antigènes de surface de promastigotes (PSA en abrégé) et possèdent des régions caractéristiques illustrées sur les figures 3A et 3B. Ces protéines peuvent être modifiées post-
10 traductionnellement par des N-glycosylations, phosphorylations et l'ancrage d'un GPI. Elles possèdent un peptide signal hydrophobe en position carboxy-terminale.

Par clonage directionnel des séquences définies ci-dessus dans un vecteur d'expression, les inventeurs ont obtenu des constructions permettant de les exprimer en position sens.

15 L'invention vise donc des constructions d'acides nucléiques, caractérisées en ce qu'elles comportent des acides nucléiques isolés en position sens, capables de coder pour une protéine immunogène de formes promastigotes ou de formes amastigotes de *Leishmania* répondant à l'une des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5.

20 L'invention vise notamment les constructions d'acides nucléiques comportant des séquences de clones d'ADNc appartenant à une famille répondant aux caractéristiques illustrées par la figure 2 et comprenant en particulier un site de restriction *Sall* et deux sites de restriction *HindIII*, avec un codon stop situé en aval du premier site *HindIII*.

25 Les clones d'ADNc comportant un site de restriction *EcoRV* et/ou *PstI* entre les deux sites *Sall* et *HindIII*, ou de part et d'autre du site *Sall* sont particulièrement préférés.

Des constructions particulièrement avantageuses comportent comme séquences d'acides nucléiques, une séquence choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°5.

30 Des constructions préférées comportent lesdites séquences d'acides nucléiques dans un plasmide à multiplication rapide tel que pTex.

Elle vise également les souches de *Leishmania* transfectées par de telles constructions qu'il s'agisse de formes promastigotes, ou de formes amastigotes.

Des souches transfectées préférées, compte tenu des applications vaccinales visées, sont des souches de *L.infantum*.

5 De manière avantageuse les PSA sont produites en grande quantité, de manière constitutive, dans les parasites.

L'invention vise également un procédé de transfection d'un parasite de *Leishmania*, caractérisé en ce qu'on introduit dans le parasite de *Leishmania* un vecteur tel que défini plus haut, comportant un marqueur, on sélectionne les parasites transfectés
10 grâce audit marqueur, on les met en culture dans un milieu axénique et asérique totalement défini et on récupère le surnageant de culture qui renferme les protéines immunogènes présentes dans des concentrations de l'ordre de 10 à 20 fois supérieures à celle produite par la souche mère de *Leishmanie*.

L'introduction du vecteur dans le parasite est par exemple réalisée par
15 électroporation.

L'insertion de ces acides nucléiques dans les parasites permet d'augmenter le pouvoir infectieux de ces derniers : leur capacité à survivre dans le macrophage infecté et à s'y multiplier est supérieure jusqu'à 5 fois celle du parasite non transfecté par de tels acides nucléiques.

20 Lesdites PSA sont produites en grande quantité dans le surnageant du milieu de culture des parasites. L'invention vise donc également les surnageants des milieux de cultures desdits parasites génétiquement modifiés, ainsi que les PSA isolées à partir de ces surnageants et purifiées.

L'invention fournit ainsi des moyens de grand intérêt pour répondre à la demande
25 industrielle de disposer de quantités importantes de protéines constituant des facteurs de virulence/pathogénicité chez les *Leishmanies*.

Grâce à leur pouvoir immunogène, ces protéines permettent d'obtenir, après immunisation d'animaux selon des techniques classiques, des anticorps polyclonaux et d'élaborer des anticorps monoclonaux. L'immunisation de souris a ainsi permis
30 d'obtenir des anticorps anti Ig G2A et celle de chien des anticorps IgG2.

L'invention vise donc également de tels anticorps et mise à profit de leurs propriétés pour élaborer à une échelle exportable industriellement des compositions vaccinales contre les *leishmanies* chez l'homme ou animal.

Les applications diagnostiques de ces anticorps font également partie de l'invention.

5 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention seront donnés dans les exemples qui suivent dans lesquels il sera fait référence aux figures 1 à 6 , qui représentent, respectivement :

- la figure 1, l'alignement en 3' des séquences nucléotidiques de clones d'ADNc selon l'invention ;

10 - la figure 2, un schéma récapitulatif des séquences nucléotidiques des clones d'ADNc obtenus après criblage immunologique par un anticorps monoclonal anti-AES des banques d'expression des formes promastigotes et des formes amastigotes de *L. amazonensis*. Les sites des enzymes de restriction sont indiqués au-dessus de chaque séquence ;

15 - la figure 3A, la localisation de différentes régions protéiques, caractérisées par leur composition particulière en acides aminés, présentes sur la séquence protéique déduite de l'ADNc du clone A3B, et la figure 3B une représentation schématique de la séquence protéique déduite de l'ADNc du clone A3B codant pour une PSA ;

- la figure 4, les analyses des transcrits par RT-PCR chez les formes promastigotes (P) et amastigotes (A) ;

20 - la figure 5, le niveau de production de la protéine par western-blotting, à l'aide d'un anticorps anti-PSA, et

- la figure 6, l'effet de la surexpression d'une PSA de *L. amazonensis* sur le pouvoir infectieux des parasites.

25

1 - Caractérisation moléculaire des immunogènes majeurs des AES des formes promastigotes et amastigotes de *L. amazonensis*. (*Lma* en abrégé)

Cette caractérisation a été effectuée en criblant des banques d'expression d'ADNc des formes promastigotes et des formes amastigotes de *L. amazonensis* à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'immunogène majeur des AES.

30

- Caractéristiques des banques d'ADNc :

Deux banques d'expression d'ADNc, respectivement de formes promastigotes, et de formes amastigotes de *L. amazonensis* ont été réalisées. Les caractéristiques de ces banques sont présentées au tableau I. Les parasites de phase exponentielle et stationnaire ont été mélangés afin d'avoir accès aux différents transcrits pouvant être exprimés au cours des différentes étapes de leur culture *in vitro*. 5 x 10⁴ phages par banque ont ensuite été criblés immunologiquement avec l'anticorps monoclonal F5 dilué au 1/500^{ème}. L'obtention de cet anticorps fait l'objet de l'exemple dans le brevet FR mentionné ci-dessus.

Tableau I

Banque d'ADNc Lma LES	Promastigotes	Amastigotes
J4 + J7		
récoltes J4 + J7	7,8.10 ⁹	7,8.10 ⁹
Titration après packaging	350 000	500 000
Titre après amplification	8,32.10 ⁷ ph/ul	2,16.10 ⁸ ph/ul

J4 + J7 = parasites récoltés au 4^{ème} jour, en phase exponentielle, et au 7^{ème} jour, en phase stationnaire de leur croissance.

- Isolement et séquençage des clones reconnus par l'anticorps monoclonal F5

13 clones de la banque promastigote et 11 clones de la banque amastigote se sont révélés positifs. Tous ces clones ont été isolés par criblage secondaire et tertiaire.

L'ADN plasmidique de l'ensemble des clones isolés a été analysé après différentes digestions enzymatiques et les ADNc possédant des inserts de plus grande taille, par digestion *EcoRI/XhoI*, ont été retenus afin d'éliminer les ADNc trop tronqués en 5'. Comme le montre le tableau II, les clones 1A1, 1B1, 2B3, 2C1, 2D1 et 2E1 de la banque d'ADNc de promastigotes et les clones A3B, V4A, V5, W2 et W3 de la banque d'amastigotes présentent les inserts de plus grande taille.

L'analyse de ces clones, en déterminant la présence ou non de deux sites d'enzymes de restriction (*HindIII* et *Sall*) préalablement sélectionnés, a montré qu'ils présentaient une forte homologie de leur séquence nucléotidique.

EcoRI/XhoI (kb)	2,3	2-2,2	2,2	?	2,3	2,3	2	2	2,3	2,2	1,7
Carte de restriction											
<i>Sall</i>	O	O	O	N	O	O	N	N	O	O	N
<i>HindIII</i>	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
<i>HindIII/Sall</i> (pb)	505	500	500	N	500	500	N	N	600	500<	N
Expression de protéine recombinante											
(kDa)	42,5	/	36,5	/	36,5	43	/	/	45	/	/

O= oui, pour site présent ; N= non, pour site absent ; / = réalisé ; ? = résultat non obtenu.

Le tableau II donne également les résultats relatifs à la capacité des clones à exprimer une protéine recombinante. L'IPTG a été utilisé comme agent d'induction. Les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE et immunoblot en présence de l'anticorps anti-AES des formes promastigotes et/ou des formes amastigotes, préalablement absorbé en présence de lysat de *E. coli*. On obtient des résultats équivalents. On note pour les clones d'intérêt l'expression de différentes protéines recombinantes allant de 42,5 kDa de poids moléculaire apparent (clone 2C1), à 43 kDa (clone A3B) ou 45 kDa (1A1 et W2).

On rapporte sur le document "Listage des séquences", les résultats du séquençage :

- des trois types de clones suivants de la banque promastigote :

. le clone de type 1A1, qui exprime une protéine de plus grand poids moléculaire. Les clones de type 1B1 et 2B3 sont du même type que ce clone ;

. le clone 2C1 (SEQ ID N°2), qui exprime une protéine recombinante de poids moléculaire inférieur à celle du clone 1A1 ;

. le clone 2G1, qui a la particularité de posséder un petit fragment *HindIII/Sall* ;

- des deux clones suivants de la banque amastigote :

- . les clones de type A3B, qui expriment une protéine recombinante d'environ 43 kDa et possèdent un fragment *HindIII/SalI* de 500 pb, le clone V5 apparaissant identique. Les clones V2D et V4A sont considérés comme des clones tronqués du même type ;
- . le clone W2, qui exprime une protéine recombinante de 45 kDa et qui présente un fragment *HindIII/SalI* de 600 pb.

. Etude des cinq séquences d'ADNc

L'alignement des cinq séquences d'ADNc obtenues est représenté à la figure 1 où les différences entre ces clones sont seulement dues à la présence d'une séquence tronquée en 5' et/ou l'insertion de séquences d'environ 72 nucléotides du côté 5'. Les clones présentent ainsi une (clones 2C1 et A3B) ou trois (clones 1A1 et W2) insertions. Hormis ces zones d'insertions, les clones présentent des homologies de l'ordre de 99% et peuvent être considérés comme appartenant à une famille d'ADNc. Seul le clone A3B possède le codon ATG d'initiation, les autres clones étant tronqués en 5'. Cependant l'ADNc A3B ne possède pas la séquence de 39 nt codant pour le "splice leader" retrouvée en 5' sur tous les ARNm de *Leishmania*.

Les ADNc des clones A3B et 2C1 présentent une homologie quasi totale et sont donc considérés comme identiques, l'ADNc du clone 2C1 correspondant à une partie tronquée en 5' de l'ADNc du clone A3B.

Le clone A3B, représentatif de cette famille a fait l'objet d'un séquençage entier dans les deux sens.

On a rapporté sur la figure 2 les sites des enzymes de restrictions pour chacun de ces clones.

Les séquences SEQ ID N°1 à 5, correspondent respectivement à celles des ADNc de A3B, 2C1, 1A1, 2G1, W2.

- Analyse des différentes séquences protéiques déduites

La traduction des différentes séquences d'ADNc en séquences protéiques a été réalisée en choisissant le cadre de lecture correspondant à celui suggéré par la

position du codon d'initiation sur le plasmide pB-SK, dont la transcription est sous le contrôle du promoteur du gène *lacZ* soumise à l'induction par l'IPTG.

La protéine A3B présente les régions illustrées sur les figures 3A et 3B. En NH₂-terminal, on identifie un peptide hydrophobe, pouvant être clivé, qui est décrit dans la littérature comme un peptide signal de la voie sécrétion. On rencontre ensuite le domaine répété riche en leucine, au nombre de 6 répétitions pour le clone A3B. A une dizaine d'acides aminés de la fin de ce domaine se trouve une région riche en proline, thréonine et sérine, appelée ci-après région poly P/T/S. Cette région est suivie d'une région riche en cystéines, pouvant être impliquée dans des ponts disulfures. Enfin la séquence protéique se termine par un peptide signal hydrophobe.

Les ADNc des clones A3B et 2C1 présentent une homologie quasi totale et sont donc considérés comme identiques, l'ADNc du clone 2C1 correspondant à une partie tronquée en 5' de l'ADNc du clone A3B.

Le clone A3B, représentatif de cette famille, a fait l'objet d'un séquençage entier dans les deux sens.

On a rapporté sur la figure 2, les sites des enzymes de restriction pour chacun de ces clones Nt=nucléotides ; ATG=codon d'initiation ; TAG=codon stop.

L'analyse sur le banque de donnée PROSITE montre que la protéine A3B possède un site de N-glycosylation localisé à la fin de chaque domaine répété riche en leucine, et 12 sites potentiels de phosphorylations.

L'analyse de la localisation de cette protéine sur le serveur PSORT prédit une localisation cytoplasmique à 92%, ce qui indique que la protéine est soluble. Cette protéine est vraisemblablement ancrée à la surface par un Glycosyl Phosphatidyl Inositol ou GPI. Le peptide signal hydrophobe peut donc être clivé et permettre l'ancrage du GPI au niveau de l'asparagine (D).

Le poids moléculaire théorique de la protéine du clone A3B diffère d'environ 2,9 kDa avec celui des protéines 1A1 et W2, ce qui est en accord avec la différence de 2,5 kDa observée entre les protéines recombinantes correspondantes. Cette différence est due à la présence d'un nombre variable de répétitions riches en leucines ou LRR, chacune présentant aussi une composition en acides aminés particulière.

Les poids moléculaires apparents et théoriques des quatre types de PSA de l'invention sont rassemblés dans le tableau III suivant.

Tableau III

5

Type de PSA	P.M. de la protéine recombinante	P.M. théorique (non tronquée)	P.M. sans peptide signal (3,2 kDa)
4 LRR (2G1)	/	33,5 kDa	30,3 kDa
6 LRR (A3B)	42,5 kDa	38,5 kDa	35,3 kDa
7 LRR (1A1 et W2)	45 kDa	41,4 kDa	38,2 kDa

2 - Obtention de parasites génétiquement modifiés :

Le clonage directionnel du gène LaPSA 38s dans le vecteur d'expression pTex a permis d'obtenir une construction capable d'exprimer le gène PSA en position sens.

10 Le plasmide pTex-LaPSA 38s orientation sens et le vecteur pTex vide ont ensuite été électroporés dans la souche sauvage *Leishmania infantum* Mon 1 Clone 1, puis les parasites ont été sélectionnés par la génétycine.

L'étude a été réalisée sur des parasites de l'espèce *L. infantum* sauvages (Sau), ceux transfectés par le pTex vide (pTex) et ceux transfectés par le pTex contenant la
15 séquence nucléotidique d'intérêt (Sens).

Caractérisation moléculaire :

L'analyse de l'ADN total par southern blot montre que la construction sens est stable et amplifiée chez la souche transformée. Les résultats sont illustrés sur la figure 4 qui donne les analyses des transcrits par RT-PCR chez les deux formes, promastigotes (P)
20 et amastigotes (A). La figure 5 donne le niveau de production de la protéine par western-blotting, à l'aide d'un anticorps anti-PSA (figure 5A : protéines constitutives ; figure 5B : protéines excrétées / sécrétées)

Caractérisation phénotypique des mutants :

La comparaison des cinétiques de croissance entre Ldi WT, Ldi pTex et Ldi Sens
25 montre que la surexpression de LaPSA 38s n'interfère pas avec la croissance des

parasites. Seule une phase de latence plus longue est observée pour les souches transformées par rapport à la souche sauvage.

La sensibilité à la lyse par le complément humain a également été étudiée. Récemment, il a été démontré que la PSA de *L. amazoniensis* avait la propriété
5 d'inhiber l'action du complément *in vitro*. Les promastigotes "sens" sont plus sensibles au complément. L'excès de PSA à la surface des parasites peut ainsi entraîner un clivage ainsi qu'une formation de complexes plus importante engendrant une lyse accrue.

Etude de pouvoir infectieux des parasites.

10 Pour étudier l'effet de la surexpression de LaPSA 38s sur le pouvoir infectieux des parasites, la première approche a consisté à mettre en contact des promastigotes des souches transformées avec des macrophages de chien, qui est le réservoir domestique naturel de la *leishmaniose* viscérale.

Les figures 6A et 6B donnent les résultats obtenus, respectivement, 2 h après contact
15 avec les promastigotes et 48 h après contact avec les amastigotes sur ces figures, l'index parasitaire correspond au % de macrophages infectés par la souche Sens x le nombre de parasites par macrophage / % de macrophages infectés par la souche témoin (pTex) x le nombre de parasites par macrophage.

Les promastigotes surexprimant LaPSA 38s, présentent un pouvoir infectieux 2 fois
20 plus important vis-à-vis des macrophages canins. De plus, après phagocytose, les amastigotes exprimant le transgène possèdent une capacité à survivre et à se multiplier dans la vacuole parasitophore significativement supérieure (2,5 à 5 fois) à celle du témoin transfecté par le vecteur vide.

REVENDICATIONS

1. Constructions d'acides nucléiques, caractérisées en ce qu'elles comportent des acides nucléiques isolés en position sens, capables de coder pour une protéine immunogène de formes promastigotes ou de formes amastigotes de *Leishmania*, lesdits acides nucléiques répondant à l'une des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5.
2. Constructions selon la revendication 1, caractérisées en ce que les séquences d'acides nucléiques sont des séquences de clones d'ADNc comprenant en particulier un site de restriction *Sall* et deux sites de restriction *HindIII*, avec un codon stop situé en aval du premier site *HindIII*.
3. Constructions selon la revendication 2, caractérisées en ce que lesdites séquences d'acides nucléiques comportent un site de restriction *EcoRV* et/ou *PstI* entre les deux sites *Sall* et *HindIII*, ou de part et d'autre du site *Sall*.
4. Constructions selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que lesdites séquences d'acides nucléiques sont clonées en position sens dans un plasmide, tel que pTex.
5. Souches de *Leishmania* génétiquement modifiées, caractérisées en ce qu'elles correspondent à des formes amastigotes ou promastigotes de *Leishmania* transfectées par une construction selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.
6. Souches selon la revendication 5, caractérisées en ce qu'il s'agit de souches de *L.infantum*.
7. Procédé de transfection d'un parasite de *Leishmania*, caractérisé en ce qu'on introduit dans le parasite de *Leishmania* une construction selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comportant un marqueur, on sélectionne les parasites transfectés grâce audit marqueur, on les met en culture dans un milieu axénique et asérique totalement défini et on récupère le surnageant de culture qui renferme les protéines immunogènes présentes dans des

concentrations de l'ordre de 10 à 20 fois supérieures à celle produite par la souche mère de *Leishmanie*.


```

A3B GTGCACGTAAGGACATGTATATATGTATGTATGTATATGAGTATGTATATATGTACGGTTATATAGGAATTTGTGT
2C1 GTGCACTTAAGGACATGTATATATGTATGTATGTATATGAGTATGTATATATGTACGGTTATATAGGAATTTGTGT
1A1 GTGCATGTAAGGACATGTATATATGTATGTATGTATGAGTATGTATATATGTACGGTTATATAGGAATTTGTGT
2G1 GTGCACTTAAGGACATGTATATATGTATGTATGTATGAGTATGTATATATGTACGGTTATATAGGAATTTGTGT
W2 GTGCACGTAAGGACATGTATATATGTATGTATGTATGAGTATGTATATATGTACGGTTATATAGGAATTTGTGT

A3B ATGTTGAGGTGTATGCATGTGCGTGCATATTAGTCTGTGCGGAGCACCGGTGTGCGCCACGGCTGCTGCCCGCTCC
2C1 ATGTTGAGGTGTATGCATGTGCGTGCATATTAGTCTGTGCGGAGCACCGGTGTGCGCCACGGCTTGTGCCCGCTCC
1A1 ATGTTGAGGTGTATGCATGTGCGTGCATATTAGTCTGTGCGGAGCACCGGTGTGCGCCACGGCTTGTGCCCGCTCC
2G1 ATGTTGAGGTGTATGCATGTGCGTGCATATTAGTCTGTGCGGAGCACCGGTGTGCGCCACGGCTTGTGCCCGCTCC
W2 ATGTTGAGGTGTATGCATGTGCGTGCATATTAGTCTGTGCGGAGCACCGGTGTGCGCCACGGCTTGTGCCCGCTCC

A3B GCTGTGCGTGTCACTCCCTGTGGGCGCGGTGGCGGGTGGCGCGGGTGGTGGCCGTGCGCGGGCGGGGGCTCCTCTGTG
2C1 GCTGTGCGTGTCCCTCCCTGTGGGCGCGGTGGCGGGTGGCGCGGGTGGTGGCCGTGCGCGGGCGGGGGCTCCTCTGTG
1A1 GCTGTGCGTGTCACTCCCTGTGGGCGCGGTGGCGGGTGGCGCGGGTGGTGGCCGTGCGCGGGCGGGGGCTCCTCTGTG
2G1 GCTGTGCGTGTCACTCCCTGTGGGCGCGGTGGCGGGTGGCGCGGGTGGTGGCCGTGCGCGGGCGGGGGCTCCTCTGTG
W2 GCTGTGCGTGTCACTCCCTGTGGGCGCGGTGGCGGGTGGCGCGGGTGGTGGCCGTGCGCGGGCGGGGGCTCCTCTGTG

A3B TTTCTATTCTCTGTCCCTGTTGACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA.....
2C1 TTTCTATTCTCTGTCCCTGTTGACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA.....
1A1 TTTCTATTCTCTGTCCCTGTTGACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA.....
2G1 TTTCTATTCTCTGTCCCTGTTGACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA.....
W2 TTTCTATTCTCTGTCCCTGTTGACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA.....

```

FIGURE 1 (Suite)

Alignement en 3' des séquences nucléotidiques des différents clones ADNc

- SEQ ID N°1 A3B
- SEQ ID N°2 2C1
- SEQ ID N°3 1A1
- SEQ ID N°4 2G1
- SEQ ID N°5 W2

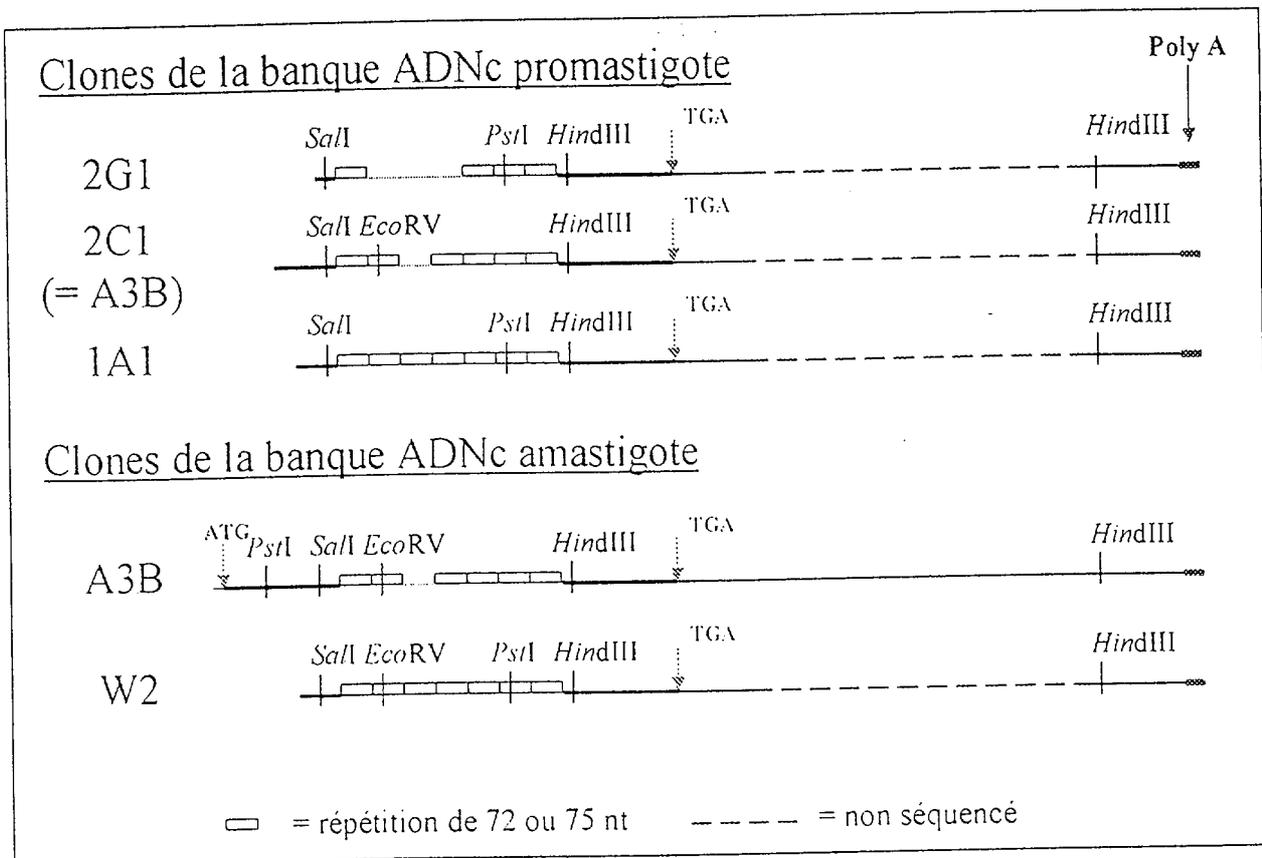


FIGURE 2

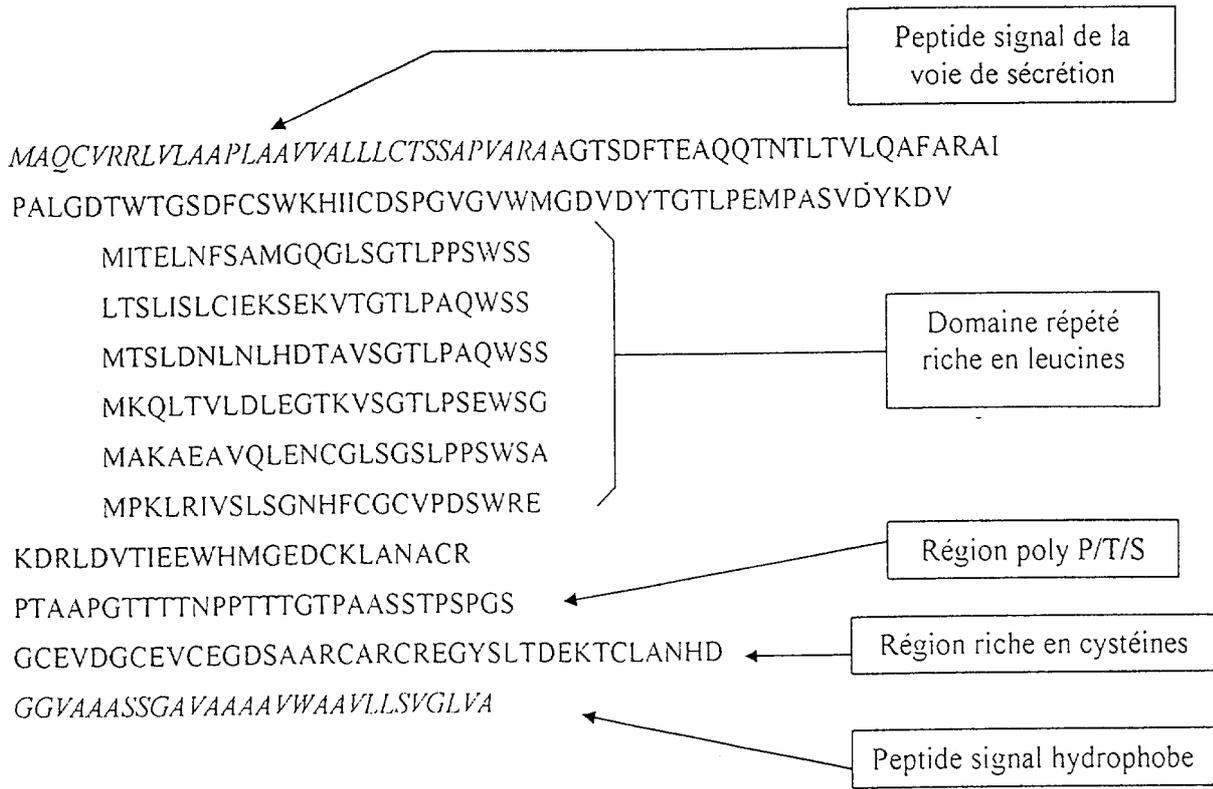


FIGURE 3A

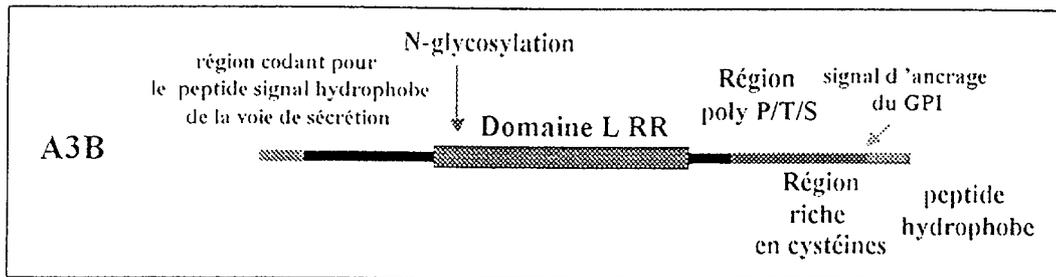
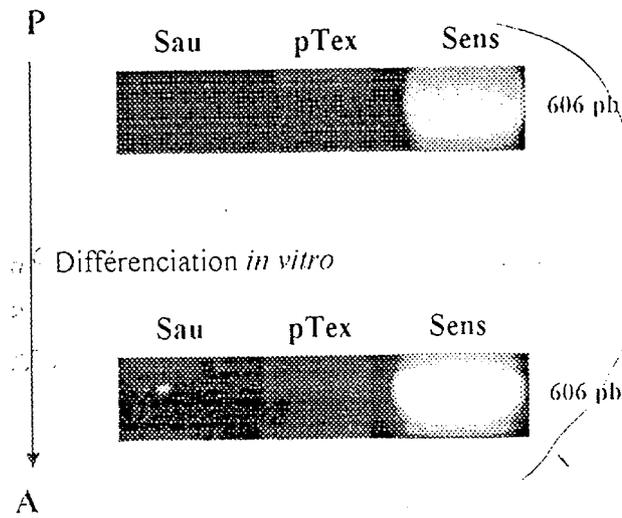
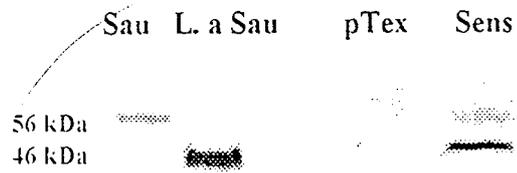


FIGURE 3B

**FIGURE 4**

-Protéines constitutives

10 µg par piste ; *L. a* : *Leishmania amazonensis*.

-Protéines excrétées/sécrétées

Sau pTex Sens L. a Sau

10µl 10µl 10µl 5µl 2µl 2µl 5µl 10µl

FIGURE 5

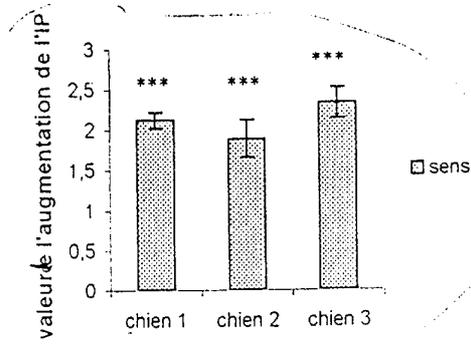


FIGURE 6A

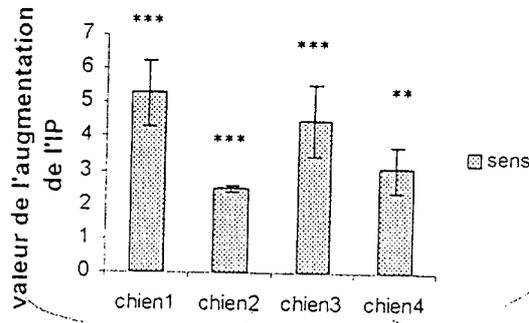


FIGURE 6B

SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUT DE LA RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (IRD)
 <120> NOUVEAUX MOYENS POUR LA PREVENTION DES LEISHMANIOSES
 <130> CP/BB 61158-1820
 <140> FR 03 13 555
 <141> 2003-12-19
 <160> 5
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 2526
 <212> DNA
 <213> Leishmania amazonensis
 <400> 1
 gacccctggt gogaatggcg cagtgcgtgc gtcggctggt gctggcggcg ccctctgccg
 60
 ctgtggtggc gctgctgctg tgcacgagca gtgcaccggt ggcgctgct ggggggacga
 120
 ggcacttac tgaggcgcag cagacgaaca cgctgacggt gctgcaggcg tttgcgctg
 180
 cgatccctgc gcttggggac acgtggacgg gcagcgactt ctgctcgtgg aagcacatca
 240
 tctgcgactc ccccggcgtc ggcgtgtgga tgggcgatgt ggattatacc ggcacgctgc
 300
 cggagatgcc tgcgagcgtc gactacaagg acgtcatgat cacggaactg aacttcagcg
 360
 caatgggcca gggctgagc gggacgctgc cccctcatg gagctcgtg acgtccttga
 420
 tatcactgtg catcgaaaag tctgagaagg tcaccggcac gctgcctgcc cagtggagct
 480
 cgatgacgtc gctggacaac ctaacctgc acgacacggc ggtctccggc acgtgcctg
 540
 cccagtggag ctogatgaag cagctgaccg ttctggatct ggagggcact aaggtgtccg
 600
 gcacgctgcc gtccgagtgg agtgggatgg cgaaggccga ggccgtgcag ctggagaact
 660
 gcggtctgtc cgggagtctg cccccctgt ggtctgcgat gccgaagctg cgtatcgtct
 720
 cactgagcgg caaccacttc tgcgggtgcg tgcccgactc gtggagggag aaggaccgcc
 780
 tcgatgtgac catogaggaa tggcacatgg gcgaggactg caagcttgct aacgcctgcc
 840
 gcccgactgc tgctccggga acgaccacga ctaaccgcc caccaccacc ggcaccccg

900

cagcctcctc tactccttct ccagggtcgg ggtgcgaggt ggatgggtgt gaggtgtgcg
960

agggggactc cgctgcgagg tgcgccaggt gccgtgaggg ctactccctg acggacgaga
1020

agacgtgcct ggccaaccac gatggcggcg tggcggcggc gtcgagcgga gcgggtggctg
1080

ccgctgctgt gtggggcggt gtgctgttga gcgtggggct ggtggcgtga ggggtgcggcg
1140

ggcacacgcy cacgcgcaca cgcctcgtg catcgcgtgt gctttccgcc gttgtggcgc
1200

ctgcacggat gcacgggcat gcggaggcgt gcatgcgtgt gcgcgtgcca gctcttgtgt
1260

gtctctccgt gtggccagca gtcggcacc cgcgccgatcg aatgtgcgcy cggcggcggt
1320

gtgtgcctt ggacagcgga tgcgggcgcc cgcctcctgc cgtgtgcct gcggctgtct
1380

gtgctgcgc gcgagcgagc tacggatgcy ctgtccggcc ctcttcgagc gggctcgtt
1440

gcgggtgtgt gctctcgtgg tctgtgcgg tgcctgcctg gcggggtgag agctggcggg
1500

ggcgtgggtg cgcgcgcggc agctctccgc tgcgttgagg gcggcctgcc cctgcgtccg
1560

cgcacogtgc cgtctcctc gacgccactg cgcgcgcttg ttggcttgct ttgctctgtc
1620

gtgcgcactc tctcttattt tccgtttcat tgcctgtat tctcttctcc caccgcactg
1680

cggcctcgtc accgcggcgc tgcggtgcy aggcgggtga tgtgccgttg tccccccct
1740

ttcatggcgc gctgggcgga tgcacctott gcctccctcc tccccctccc cctcccgcg
1800

gtcctgtcaa ttgtatatcc gtggacctta tcttcgtact gcctccgcgc ctcttcgta
1860

aagcttcgtt ggctgtgtcc gcccccgga cgtcagcgc gctgtgctcg catgctcag
1920

gtgcgtcccc gtgcgtgggc gtgcacgtaa ggacatgtat atatgtatgt gtatgtatat
1980

gagtatgtat atatgtacgg ttatatatag gaatttgtgt atgttgaggt gtatgcatgt
2040

gcgtgcgtat attagtgtgt gcgagcacgc gtgttgccgc acgctctgct gccgcctcc
2100

gctgtgcgtg tcaactcgtg tgggcgcggg gccgggtggc gccgggtggt gccctgcgg
2160

cgggcggggg ctcctctgtg tttctctatt tctctgttcc ctgttgacct caaaaaaaaa
2220

aaaaaaaaaa aaagtgcacg taaggacatg tatatatgta tgtgtatgta tatgagtatg
2280

tatatatgta cggttatata taggaatttg tgtatgttga ggtgtatgca tgtgcgtgcg
2340

tatattagtg tgtgcgagca cgcgtgttgc gccacgctct gctgcccgcc tccgctgtgc
2400

gtgtcaactcg ctgtgggagc ggtggcgggt ggcgccgggt ggtggccgtg cggcgggagc
2460

gggctctctt gtgtttctct atttctctgt tccctgttga cctcaaaaaa aaaaaaaaaa
2520

aaaaaa
2526

<210> 2
<211> 1401
<212> DNA
<213> *Leishmania amazonensis*

<400> 2
cgtggacggg cagcgacttc tgctcgtgga agcacatcat ctgcgactcc cccggcgtcg
60

gcgtgtggat gggcgtatgt gattataaccg gcacgctgcc ggagatgcct gcgagcgtcg
120

actacaagga cgtcatgata acggaactga acttoagcgc aatgggccag gggctgagcg
180

ggacgctgcc cccctcatgg agctcgtgta cgtccttgat atcaactgtgc atcgaaaagt
240

ctgagaaggt caccggcacg ctgcctgcc agtggagctc gatgacgtcg ctggacaacc
300

ttaacctgca cgacacggcg gtctccggca cgtgcctgc ccagtggagc tcgatgaagc
360

agctgaccgt tctggatctg gagggcaacta aggtgtccgg cacgctgccg tccgagtgga
420

gtgggatggc gaaggccgag gccgtgcagc tggagaactg cgtctgtcc gggagtctgc
480

cccctcgtg gtctgcgatg ccgaagctgc gtatcgtctc actgagcggc aaccacttct
540

gcgggtgcgt gcccgactcg tggagggaga aggaccgcct cgatgtgacc atcgaggaat
600

ggcacatggg cgaggactgc aagcttgcta acgcctgccg cccgactgct gctccgggaa
660

cgaccacgac taaccgcccc accaccaaccg gcaccccagc agcctctctc actccttctc
720

cagggtcggg gtgcgaggtg gatgggtgtg aggtgtgcca gggggaactcc gctgcgcggt
780

gcccaggtg ccgtgagggc tactccctga cggacgagaa gacgtgcgtg gcgaaccacg
840

atggcggcgt ggcggcggcg tcgagcggag cgggtggctgc cgctgctgtg tgggcggcgtg
900

tgctgttgag cgtggggctg gtggcgtgag ggtgcggcgg gccctcttc tctgtgtgctg
960

ccctggtgcc tgccctcgcc cccggcacgg cgctcgtcgt gccctctctc acccccacca
1020

gccgacgggg agaccgacag ccacacgcgc acgcgcacac gccgtcgtgc atcgcgtgtg
1080

cgtgcactta aggacatgta tatatgtatg tgtatgtata tgagtatgta tatatgtccg
1140

gttatatata ggaatttgtg tatgttgagg tgtatgcatg tgcgtgcgta tattagtctg
1200

tgcgagcacg cgtgttgccg cacgctttgc tgcccgcctc cgctgtgcgt gtcctcctc
1260

gtgggcgcgc tgccgggtgg ccccggtgg tgcccgctgc gggggcgggg gctcctctgt
1320

gtttctctat ttctctgttc cctgttgacc caaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa
1380

aaaaaaaaa aaaaaaaaa a
1401

<210> 3
<211> 1684
<212> DNA
<213> *Leishmania amazonensis*

<400> 3
ggacgggcag cgacttctgc tcgtggaagc acatcatctg cgactcccc ggcgtcggcg
60

tgtggatggg cgatgtggat tataccggca cgctgccgga gatgcctgag agcgtcgact
120

acaaggacgt catgatcatg gcactggact tcggcgcaat gggccagga ctgagcggga
180

cgctgcccc ctcattggagc tcgctgacgt ccttgatgac actgtggatc gaaaagtctg
240

agaaggtcac cggcacgctg cctaccagc ggagctgat gaagcagctg acccttctgc
300

atctgaaggc cactaaggtg tccggcacgc tgccgccgga gtggagtggg atgacgtcgc
360

tggacgacct taacctgcac gacacggcgg tctccggcac gctgcctgcc cagtggagct
420

cgatgaagca gctgatcgat ctggatctgg agggcactaa ggtgtccggc acgctgccgc
480

ccgagtggag tgggatggcg aaggccgagg ccctgcagct gaagtactgc gatctgtccg
540

ggagtctgcc cccctcgtgg tcttcgatgc agaagctgcg tctcgtctca ctgagcggca
600

accacttctg cgggtgcgtg cccgactcgt ggagggagaa ggaccgcctc gatgtgacca
660

tcgaggaatg gcacatgggc gaggactgca agcttgctaa cgctgcccgc ccgactgctg
720

ctccgggaac gaccacgact aaccgcacca ccaccaccgg caccacagca gcctcctcta
780

ctccttctcc agggtcgggg tgcgaggtgg atgggtgtga ggtgtgagc ggggactccg
840

ctgcgcggtg cgccaggtgc cgtgagggt actccctgac ggacgagaag acgtgcctgg
900

cgaaccacga tggcggcgtg gcggcggcgt cgagcggagc ggtggctgcg gctgctgtgt
960

ggcggctgtg gctggtgagc gtggggctgg tggcgtgagg gtgcggcggc cccctottct
1020

ctgtggtgcc cctggtgcct gccctgccc ccagcacggc gtcgtcgtg cctctcacc
1080

cccaccagcc gaaggggaga ccgacagcca cacgcacacg cgcacgcgcc gtogtgcac
1140

gcgtgtgctt tccgccgtt tggcgcctgc gcgcatgcac gggcatgccc aggcgtgcat
1200

gcgtgtgccc gtgccagctc ttgtgtgtct ctccgtgtgg ccagcagtcg gcacccgcgc
1260

cgatcgaatg tgcgcgcggc ggcgggtgtg cgcttgagc agcggatgcg gcgcccgcc
1320

ctcgcctgtg gccctgcggt ctgctgtgct gccgcgcgag cgacgtacgg agtgcattga
1380

aggacatgta tatatgatg tgtaggtata tgagtatgta tatatgtacg gttatatata
1440

ggaatttgtg tatgttgagg tgtatgcatg tgcgtgcgta tattagtctg tgcgagcacg
1500

cgtggtgccc cacgctttgc tgcccgcctc tgctgtgctg gtcactccct gtgggcgcgc
1560

tggcgggtgg cgccgggtgg tggcctgccc gcgggcgggg gctcctctgt gtttctctat
1620

ttctctgttc cctggtgacc tcaagaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1680

aaaa
1684

<210> 4
<211> 1404
<212> DNA
<213> *Leishmania amazonensis*

<400> 4
tcggcgtgtg gatggcgat gtggattata cggcacgct gccggagatg cctgcgagcg
60

tcgactacaa ggacgtcatg atcacggaac tgaacttcgg cgcaatgggc cagggactga
120

gcgggaegct gccccctca tggagctcga tgaagcagct gatcgatctg gatctggagg
180

gcactaaggt gtccggcag ctgccgccc agtggagtgg gatggcgaag gccgaggccc
240

tgcagctgaa gtactgcgat ctgtccggga gtctgcccc ctctgtgtct tcgatgcaga
300

agctgcgtat cgtctcactg agcggcaacc acttctcggg gtgcgtgcc gactcgtgga
360

gggagaagga ccgcctcgat gtgaccatcg aggaatggca catgggagag gactgcaagc
420

ttgctaaagc ctgccgccc actgctgctc cggaacgac cacgactaac ccgccacca
480

ccaccggcac ccagcagcc tcctctactc cttctccagg gtcggggtgc gaggtggatg
540

ggtgtgaggt gtgcgaggg gactccgctg cgcggtgcgc caggtgccgt gagggtact
600

ccctgacgga cgagaagac tgccctggcga accacgatgg cggcgtggcg gcggcgtcaa
660

gcggagcggg ggctgcggct gctgtgtggg cggctgtgct gttgagcgtg gggctggtgg
720

cgtgaggggt cgggggccc ctcttctctg tgggtcccct ggtgectgcc ctgcccccg
780

gcacggcgtc gtcgctgcc tctctcacc ccaccagcag acggggagac cgacagccac
840

acgcgcacgc gcacagccg tegtgcacg cgtgtgcttt ccgccgttgt ggcgcctgca
900

cggatgcacg ggcagcggg ggcgtgcacg cgtgtgcgcg tgccagctct tgtgtgtctc
960

tccgtgtggc cagcagtcgg caccgcgcc gatcgaatgt gcgcgcggcg gcgggtgtgc
1020

gccttgagca gcggatgctg gcgcccgcc ctgcgctgtg cctcggctctg cgtgtcgtgg
1080

ccgcgcgagc gacgtacgga gtgcgctgtg tgcacttaag gacatgtata tatgtatgtg
1140

tatgtatatg agtatgtata tatgtacggt tatatatagg aatttgtgta tgttgagggtg
1200

tatgcatgtg cgtgcgtata ttagtctgtg cgagcacgcg tgttgcgcca cgctttgctg
1260

cccgcctcgg ctgtgggtgt cactcgtctg gggcccgggtg gcgggtggcc ccgggtgggtg
1320

cccgttcggc gggcgggggc tcctctgtgt ttctctatct ctctgttccc tgttgccctc
1380

caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa
1404

<210> 5

<211> 1501

<212> DNA

<213> *Leishmania amazonensis*

<400> 5

ccggcgtcgg cgtgtggatg ggcgatgtgg attataccgg cacgctgccg gagatgcctg
60

cgagcgtcga ctacaaggac gtcatgatca cggaactgaa cttcagcgca atgggccagg
120

ggctgagcgg gacgctgcc cctcatgga gtcgctgac gtccttgata tcaactgtgca
180

tcgaaaagtc tgagaaggtc accggcacgc tgccctgcca gtggagctcg atgacgtcgc
240

tggacaacct taacctgac gaacaggcgg tctccggcac gctgccgcc gagtggagtg
300

ggatgacgtc gctggacgac cttaacctgc acgacacggc ggtctccggc acgctgcctg
360

cccagtggag ctcgatgaag cagctgatcg atctggatct ggagggcact aagggtgccg
420

gcacgctgcc gcccgagtgg agtgggatgg cgaaggccga ggcctgcag ctgaagtact
480

gogatctgtc cgggagtctg cccccctcgt ggtcttcgat gcagaagctg cgtatcgtct
540

cactgagcgg caaccacttc tgcgggtgcg tgcccgaact gtggagggag aaggaccgcc
600

tcgatgtgac catcgaggaa tggcacatgg gcgaggactg caagcttctt aacgcctgcc
660

gcccgactgc tgctccggga acgaccacga ctaaccogcc caccaccacc ggcacccag
720

cagcctcctc tactccttct ccagggtcgg ggtgcgaggt ggatgggtgt gaggtgtgcg
780

agggggactc cgctgcgcg tgcgccaggt gccgtgaggg ctactccctg acggacgaga
840

agacgtgcct ggcgaaccac gatggcgggc tggcgggcgc gtaagcgga gcggtggctg
900

cggtctgtgt gtggcgggct gtgctgttga gcgtggggct ggtggcgtga gggtgccgcc
960

gccccctott ctctgtggg ccctgggtgc ctgccctgc cccagcacg gggctgtgc
1020

tgccctctca cccccaccag ccgaagggga gaccgacagc cacacgcaca cgcgcacgcg
1080

ccgtctgtga tgcgctgtgc ttccgcccgt tgtggcgccct gcgcggtatgc acgggcatgc
1140

ggagggcgtgc atgcgctgtgc gcgtgccaac tcttgtgtgt ctctccgtgt gccagcagt
1200

cggcaccogt gcacgtaagg acatgtatat atgtatgtgt aggtatatga gtatgtatat
1260

atgtacggtt atatatagga atttgtgtat gttgaggtgt atgcatgtgc gtgcgtatat
1320

tagtctgtgc gagcacgct gttgcgccac gctctgctgc ccgcctctgc tgtgcgtgct
1380

actcgtgtg ggcgctgtg cgggtggcgc cgggtgggtg ccgtgcggcg ggcgggggct
1440

cctctgtgtt tctctatttc tctgttccct gttgacctca agaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1500

a
1501



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 649219
FR 0313555

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	LOHMAN KL ET AL: "Molecular cloning and characterization of the immunologically protective surface glycoprotein GP46/M-2 of Leishmania amazonensis" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 87, novembre 1990 (1990-11), pages 8393-8397, XP002204079 ISSN: 0021-9258 * figures 2,3 *	1-7	C12N15/79 C12N15/30 C12N1/11
Y	BEETHAM JEFFREY K ET AL: "Glycoprotein 46 mRNA abundance is post-transcriptionally regulated during development of Leishmania chagasi promastigotes to an infectious form" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 28, 1997, pages 17360-17366, XP002296788 ISSN: 0021-9258 * abrégé; figure 1 *	1-7	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
Y	MURRAY P J ET AL: "VARIANTS OF A LEISHMANIA SURFACE ANTIGEN DERIVED FROM A MULTIGENIC FAMILY" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 36, 1991, pages 24477-24484, XP002296789 ISSN: 0021-9258 * abrégé; figures 5-10 *	1-7	C07K C12N
D,Y	WO 94/26899 A (LEMESRE JEAN LOUP ; ORSTOM (FR)) 24 novembre 1994 (1994-11-24) * page 59 - page 63; figure 8 *	1-7	
-/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
17 septembre 2004		Espen, J	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>	

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 649219
FR 0313555

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	JIMENEZ-RUIZ A ET AL: "CLONING SEQUENCING AND EXPRESSION OF THE PSA GENES FROM LEISHMANIA INFANTUM" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 251, no. 1/2, 15 janvier 1998 (1998-01-15), pages 389-397, XP001159173 ISSN: 0014-2956 -----		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		17 septembre 2004	Espen, J
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>	

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0313555 FA 649219**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 17-09-2004

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9426899 A	24-11-1994	FR 2705358 A1	25-11-1994
		AU 6800094 A	12-12-1994
		CA 2162555 A1	24-11-1994
		EP 0698099 A1	28-02-1996
		WO 9426899 A1	24-11-1994
		US 2003068690 A1	10-04-2003
		US 2003059860 A1	27-03-2003
		US 2003138461 A1	24-07-2003
		US 6458581 B1	01-10-2002
