

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 Cl<sup>7</sup> : 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) ;

- 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 10<sup>4</sup> phages par banque ont ensuite été criblés immunologiquement avec l'anticorps monoclonal F5 dilué au 1/500<sup>ème</sup>. 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 <sup>9</sup>	7,8.10 <sup>9</sup>
Titration après packaging	350 000	500 000
Titre après amplification	8,32.10 <sup>7</sup> ph/ul	2,16.10 <sup>8</sup> ph/ul

J4 + J7 = parasites récoltés au 4<sup>ème</sup> jour, en phase exponentielle, et au 7<sup>ème</sup> 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 NH<sub>2</sub>-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*.

SEQ ID N°1	A3B	GACCCCTGTTGCCA
A3B	13B	ATGCGCGAGTGCCTGGCGTCCGCTGGTGTGCGCGCGCCCTCCGCGCTGTGGTGGCCCTGCTGCTGTGCACGAGCAGTGCACCGGTGGCGCGTGCCTGGC 114
SEQ ID N°2	2G1	CGTGGACGGGCAG 13
SEQ ID N°3	2C1	GGACGGGCAG 10
A3B	1A1	GGACGGGCAGTTCCTACTGAGGGCCAGCAGACGAAACACCGCTGACGGTGTGCACGGCTTTGGCGTGGCATCCCTGGCTTGGGACACGTGGACGGGCAG 214
W2		
SEQ ID N°4	2G1	TCGGCGTGTGGATGGGCGATGTGGATTATACCGGCACCGTCCCGGAGATGCCCTGG 56
2C1		CGACTTCTGCTGGTGAAGCACAATCTCTGGACTCCCGCGGCGTGGCGTGTGGATGGGCGATGTGGATTATACCGGCACCGTCCCGGAGATGCCCTGG 42
1A1		CGACTTCTGCTGGTGAAGCACAATCTCTGGACTCCCGCGGCGTGGCGTGTGGATGGGCGATGTGGATTATACCGGCACCGTCCCGGAGATGCCCTGG 110
A3B		CGACTTCTGCTGGTGAAGCACAATCTCTGGACTCCCGCGGCGTGGCGTGTGGATGGGCGATGTGGATTATACCGGCACCGTCCCGGAGATGCCCTGG 314
W2		CGCGGTGGCGTGTGGATGGGCGATGTGGATTATACCGGCACCGTCCCGGAGATGCCCTGG 62
2G1		AGCGTGCAGTACAGGACGTCATGATCACGGAACTGAACTTCGGCGGAATGGGCCAGGACCTGAGCGGGACCGTCCCGCCCTCATGGAGCTCC 149
2C1		AGCGTGCAGTACAGGACGTCATGATCACGGAACTGAACTTCAGCCCAATGGGCCAGGGGCTGAGCGGGACCGTCCCGCCCTCATGGAGCTCCGCTGACGT 213
1A1		AGCGTGCAGTACAGGACGTCATGATCACGGAACTGAACTTCAGCCCAATGGGCCAGGGGCTGAGCGGGACCGTCCCGCCCTCATGGAGCTCCGCTGACGT 210
A3B		AGCGTGCAGTACAGGACGTCATGATCACGGAACTGAACTTCAGCCCAATGGGCCAGGGGCTGAGCGGGACCGTCCCGCCCTCATGGAGCTCCGCTGACGT 414
W2		AGCGTGCAGTACAGGACGTCATGATCACGGAACTGAACTTCAGCCCAATGGGCCAGGGGCTGAGCGGGACCGTCCCGCCCTCATGGAGCTCCGCTGACGT 162
2G1		CCCTTGATATCACTGTGCATCGAAAGTCTGAGAAGGTCAACGGCACGCTGCTGCCAGTGGAGCTCG 231
2C1		CCCTTGATATCACTGTGCATCGAAAGTCTGAGAAGGTCAACGGCACGCTGCTGCCAGTGGAGCTCGATGAGCAGCTGACCCCTTCTGCATCTGAAGGG 310
1A1		CCCTTGATATCACTGTGCATCGAAAGTCTGAGAAGGTCAACGGCACGCTGCTGCCAGTGGAGCTCG 482
A3B		CCCTTGATATCACTGTGCATCGAAAGTCTGAGAAGGTCAACGGCACGCTGCTGCCAGTGGAGCTCGATGAGCAGCTGAGAACCTTAACTTCACGA 262
W2		
2G1		ATGACCTGCTGGACAACCTTAACTGCACGACACCGCGGTCTCCGGCACGCTGCCCTGCC 341
2C1		CACATAAGGTGTCCGGCACGCTGCCCGCGAGTGGAGTGGGATGAGCTGCGTGGACACCTTAACTGCACGACACCGCGGTCTCCGGCACGCTGCCCTGCC 410
1A1		ATGACCTGCTGGACAACCTTAACTGCACGACACCGCGGTCTCCGGCACGCTGCCCTGCC 542
A3B		CACGCGCGTCTCCGGCACGCTGCCCGCGAGTGGAGTGGGATGAGCTGCGTGGACACCTTAACTGCACGACACCGCGGTCTCCGGCACGCTGCCCTGCC 362
W2		
2G1		ATGAAGCAGCTGATCGATCTGGATCTGGAGGGCACTAAGGTGTCCGGCACGCTGCCCGCGAGTGGAGTGGGATGGCGAAGGCCGAGG 237
2C1		CAGTGGAGCTCGATGAAGCAGCTGACCGTCTGGATCTGGATCGGGCACTAAGGTGTCCGGCACGCTGCCCGCGAGTGGAGTGGGATGGCGAAGGCCGAGG 441
1A1		CAGTGGAGCTCGATGAAGCAGCTGATCGATCTGGATCTGGAGGGCACTAAGGTGTCCGGCACGCTGCCCGCGAGTGGAGTGGGATGGCGAAGGCCGAGG 310
A3B		CAGTGGAGCTCGATGAAGCAGCTGACCGTCTGGATCTGGAGGGCACTAAGGTGTCCGGCACGCTGCCCGCGAGTGGAGTGGGATGGCGAAGGCCGAGG 642
W2		CAGTGGAGCTCGATGAAGCAGCTGATCGATCTGGATCTGGAGGGCACTAAGGTGTCCGGCACGCTGCCCGCGAGTGGAGTGGGATGGCGAAGGCCGAGG 462
2G1		CCCTGCAGCTGAAAGTACTGCGAATCTGTCCGGAGTCTGCCCGCTCGTGGTCTTCGATGCAAGAGTCCGATCTGCTCACTGAGCGGCAACCACTTCTG 337
2C1		CCCTGCAGCTGAAAGTACTGCGAATCTGTCCGGAGTCTGCCCGCTCGTGGTCTTCGATGCAAGAGTCCGATCTGCTCACTGAGCGGCAACCACTTCTG 541
1A1		CCCTGCAGCTGAAAGTACTGCGAATCTGTCCGGAGTCTGCCCGCTCGTGGTCTTCGATGCAAGAGTCCGATCTGCTCACTGAGCGGCAACCACTTCTG 610
A3B		CCCTGCAGCTGAAAGTACTGCGAATCTGTCCGGAGTCTGCCCGCTCGTGGTCTTCGATGCAAGAGTCCGATCTGCTCACTGAGCGGCAACCACTTCTG 742
W2		CCCTGCAGCTGAAAGTACTGCGAATCTGTCCGGAGTCTGCCCGCTCGTGGTCTTCGATGCAAGAGTCCGATCTGCTCACTGAGCGGCAACCACTTCTG 562
2G1		CGGGTGGCTGCCGACTCGTGGAGGGGAGAAAGACCGCTCGATGTGACCATCGAGGAATGGACATGGCCGAGGACTGCAAGCTTGTCTAACGGCTGCCCG 437
2C1		CGGGTGGCTGCCGACTCGTGGAGGGGAGAAAGACCGCTCGATGTGACCATCGAGGAATGGACATGGCCGAGGACTGCAAGCTTGTCTAACGGCTGCCCG 641
1A1		CGGGTGGCTGCCGACTCGTGGAGGGGAGAAAGACCGCTCGATGTGACCATCGAGGAATGGACATGGCCGAGGACTGCAAGCTTGTCTAACGGCTGCCCG 710
A3B		CGGGTGGCTGCCGACTCGTGGAGGGGAGAAAGACCGCTCGATGTGACCATCGAGGAATGGACATGGCCGAGGACTGCAAGCTTGTCTAACGGCTGCCCG 842
W2		CGGGTGGCTGCCGACTCGTGGAGGGGAGAAAGACCGCTCGATGTGACCATCGAGGAATGGACATGGCCGAGGACTGCAAGCTTGTCTAACGGCTGCCCG 662
2G1		CGGACTGCTGCTCCGGGAACGACACGACTAACCCGCCACCCACCCCGGACCCACGACGCTCTCTACTCTTCTCCAGGGTTCGGGTGGAGGTGG 537
2C1		CGGACTGCTGCTCCGGGAACGACACGACTAACCCGCCACCCACCCCGGACCCACGACGCTCTCTACTCTTCTCCAGGGTTCGGGTGGAGGTGG 741
1A1		CGGACTGCTGCTCCGGGAACGACACGACTAACCCGCCACCCACCCCGGACCCACGACGCTCTCTACTCTTCTCCAGGGTTCGGGTGGAGGTGG 810
A3B		CGGACTGCTGCTCCGGGAACGACACGACTAACCCGCCACCCACCCCGGACCCACGACGCTCTCTACTCTTCTCCAGGGTTCGGGTGGAGGTGG 942
W2		CGGACTGCTGCTCCGGGAACGACACGACTAACCCGCCACCCACCCCGGACCCACGACGCTCTCTACTCTTCTCCAGGGTTCGGGTGGAGGTGG 762
2G1		ATGGGTGTGAGGTGTGGAGGGGGACTCCGCTGCGCGGTGGCGCAGGTGCGGTGAGGGCTACTCCCTGACGGACGAGAAGACGCTGCCCTGGCGAACCAGG 637
2C1		ATGGGTGTGAGGTGTGGAGGGGGACTCCGCTGCGCGGTGGCGCAGGTGCGGTGAGGGCTACTCCCTGACGGACGAGAAGACGCTGCCCTGGCGAACCAGG 841
1A1		ATGGGTGTGAGGTGTGGAGGGGGACTCCGCTGCGCGGTGGCGCAGGTGCGGTGAGGGCTACTCCCTGACGGACGAGAAGACGCTGCCCTGGCGAACCAGG 910
A3B		ATGGGTGTGAGGTGTGGAGGGGGACTCCGCTGCGCGGTGGCGCAGGTGCGGTGAGGGCTACTCCCTGACGGACGAGAAGACGCTGCCCTGGCGAACCAGG 1042
W2		ATGGGTGTGAGGTGTGGAGGGGGACTCCGCTGCGCGGTGGCGCAGGTGCGGTGAGGGCTACTCCCTGACGGACGAGAAGACGCTGCCCTGGCGAACCAGG 862
2G1		TGGCGGCTGGCGCGCGCTCAAGCGGAGCGGTGGCTGCGGCTGTGTGGCGGCTGTGCTGTGAGCGTGGGGTGGTGGCGTGAAGGTGGCGCGGG 737
2C1		TGGCGGCTGGCGCGCGCTCAAGCGGAGCGGTGGCTGCGGCTGTGTGGCGGCTGTGCTGTGAGCGTGGGGTGGTGGCGTGAAGGTGGCGCGGG 941
1A1		TGGCGGCTGGCGCGCGCTCAAGCGGAGCGGTGGCTGCGGCTGTGTGGCGGCTGTGCTGTGAGCGTGGGGTGGTGGCGTGAAGGTGGCGCGGG 1010
A3B		TGGCGGCTGGCGCGCGCTCAAGCGGAGCGGTGGCTGCGGCTGTGTGGCGGCTGTGCTGTGAGCGTGGGGTGGTGGCGTGAAGGTGGCGCGGG 1142
W2		TGGCGGCTGGCGCGCGCTCAAGCGGAGCGGTGGCTGCGGCTGTGTGGCGGCTGTGCTGTGAGCGTGGGGTGGTGGCGTGAAGGTGGCGCGGG 962
2G1		CCCTCTTCTCTGTGGTGCCTTGGTGGCTGCCCTGCCCGCGGACCGGCTGCTGCTGCCCTCTCTACCCCCACAGCCGACGGGGAGACCGACAG 837
2C1		CCCTCTTCTCTGTGGTGCCTTGGTGGCTGCCCGCGGACCGGCTGCTGCTGCCCTCTCTACCCCCACAGCCGACGGGGAGACCGACAG 1041
1A1		CCCTCTTCTCTGTGGTGCCTTGGTGGCTGCCCGCGGACCGGCTGCTGCTGCCCTCTCTACCCCCACAGCCGACGGGGAGACCGACAG 1108
A3B		CCCTCTTCTCTGTGGTGCCTTGGTGGCTGCCCGCGGACCGGCTGCTGCTGCCCTCTCTACCCCCACAGCCGACGGGGAGACCGACAG 1242
W2		CCCTCTTCTCTGTGGTGCCTTGGTGGCTGCCCGCGGACCGGCTGCTGCTGCCCTCTCTACCCCCACAGCCGACGGGGAGACCGACAG 1061
2G1		CACACGGCACCGGACACCGCGTGTGCATCGGCTGTGCTTCCGCGTGTGGCGGCTGCACGGATGCACGGGCATCGGAGGCGTGCATGCGTGTGC 937
2C1		CACACGGCACCGGACACCGCGTGTGCATCGGCTGTGCTTCCGCGTGTGGCGGCTGCACGGATGCACGGGCATCGGAGGCGTGCATGCGTGTGC 1081
1A1		CACACGGCACCGGACACCGCGTGTGCATCGGCTGTGCTTCCGCGTGTGGCGGCTGCACGGATGCACGGGCATCGGAGGCGTGCATGCGTGTGC 1208
A3B		CACACGGCACCGGACACCGCGTGTGCATCGGCTGTGCTTCCGCGTGTGGCGGCTGCACGGATGCACGGGCATCGGAGGCGTGCATGCGTGTGC 1342
W2		CACACGGCACCGGACACCGCGTGTGCATCGGCTGTGCTTCCGCGTGTGGCGGCTGCACGGATGCACGGGCATCGGAGGCGTGCATGCGTGTGC 1161
2G1		GCCTGCCAGCTTGTGTGTCTCTCGTGTGGCCAGCAGTCCGACCCCGCGCATGCAATGTGCGCGCGCGCGGCTGTGCTGCCCTGGACAGCGGATG 1037
2C1		GCCTGCCAGCTTGTGTGTCTCTCGTGTGGCCAGCAGTCCGACCCCGCGCATGCAATGTGCGCGCGCGCGGCTGTGCTGCCCTGGACAGCGGATG 1508
1A1		GCCTGCCAGCTTGTGTGTCTCTCGTGTGGCCAGCAGTCCGACCCCGCGCATGCAATGTGCGCGCGCGCGGCTGTGCTGCCCTGGACAGCGGATG 1442
A3B		GCCTGCCAGCTTGTGTGTCTCTCGTGTGGCCAGCAGTCCGACCCCGCGCATGCAATGTGCGCGCGCGCGGCTGTGCTGCCCTGGACAGCGGATG 1209
W2		
2G1		CTGGCGCGCGCCCTCGG-GTGTGCC-TC-GGTCTCCGTGTGCTGGCGCGCGGAGCGAGTACCGGAGTGGCGTGT 1109
1A1		C-GGGCGCGCCCTCGGCGTGTGCCCTGGGTCTG-TGTGCTG-CCGCGCGGAGCGAGTACCGG 1371
A3B		CGGGCGCGCCCTCGGCGTGTGCCCTGGGTCTG-TGTGCTG-CCGCGCGGAGCGAGTACCGG-TGGCGTGTCCGGCCCTCTCCGACGGGGCTCGCT 1439
A3B		TGCGGTGTGTGCTCTCGTGGTCTGTGCGGGTGTGCCCTGGCGGGTGTGAGGCTGGCGGGGGCTGGGTGGCGCGCGGACGCTCTCCGCTCGGTGAG 1539
A3B		GGCGGGCTGCCCTGCGTCCGCGCACCGTGGCGGCTCTCTCGAGCCACTGCGCGGCGTGTGGCTTGTCTGTGCTGCGCACCTCTCTTATT 1639
A3B		TTCCCTTTCAATCCGCTGTATTCTTCTTCCACCGCAGTGGCGGCTGTCACCGCGCGGCTGGCGTGGCGAGGCGGGTGTGCTGCCCTTGTGCCCTCC 1739
A3B		TTTCAATGGCGCGTGGCGGATCCGCTTTCGCTCTCTCTCCCTCCCTCCCGGCTGTCAATTGTATATCCGTTGACCTTATCTTCTGAT 1839
A3B		TGCTTCCGCGCTCTCCGTAAGAGCTTGTGGCGTGTCCGCGCCCGGACCTGCGCGGCTGTGCTGCGCATGCTCAACGTTGCTGATGTTGAGTGTATGATG 1939
A3B		CGTGCACGTAAGGACATGTATATAGTATGTATGTATGTATATAGTATGTATGTACGGTTATATAGGAATTTGTGTATGTTGAGTGTATGATG 2039
A3B		TGCGTGGCTATATAGTGTGTGCGGACACCGTGTGGCCAGCTCTGCTGCCCTCCGCTGTGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 2139
A3B		CGCGGGTGGTGGCGTGGCGCGGGCGGGGCTCTCTGTGTTCT 2233

FIGURE 1

Alignement des différentes séquences ADNc obtenues

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



```

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

A3B ATGTTGAGGTGTATGCATGTGCGTGCCTATATTAGTCTGTGCGGAGCACCGGTGTGCGCCACGGCTGCTGCCCGCTCC
2C1 ATGTTGAGGTGTATGCATGTGCGTGCCTATATTAGTCTGTGCGGAGCACCGGTGTGCGCCACGGCTTGTGCCCGCTCC
1A1 ATGTTGAGGTGTATGCATGTGCGTGCCTATATTAGTCTGTGCGGAGCACCGGTGTGCGCCACGGCTTGTGCCCGCTCC
2G1 ATGTTGAGGTGTATGCATGTGCGTGCCTATATTAGTCTGTGCGGAGCACCGGTGTGCGCCACGGCTTGTGCCCGCTCC
W2 ATGTTGAGGTGTATGCATGTGCGTGCCTATATTAGTCTGTGCGGAGCACCGGTGTGCGCCACGGCTTGTGCCCGCTCC

A3B GCTGTGCGGTGTCACCTCGCTGTGGGCGCGGTGGCGGGTGGCGCGGGTGGTGGCCGTGCGGCGGGCGGGGGCTCCTCTGTG
2C1 GCTGTGCGGTGTCCTCCCTGTGGGCGCGCTGC CGGGTGGCCCGGGTGGTGC CCGTGGCGGGCGGGGGCTCCTCTGTG
1A1 GCTGTGCGGTGTCACCTCCCTGTGGGCGCGCTGGCGGGTGGCGCGGGTGGTGGCCGTGCGGCGGGCGGGGGCTCCTCTGTG
2G1 GCTGTGCGGTGTCACCTCGCTGTGGGCGCGGTGGCGGGTGGCGCGGGTGGTGC CCGTGGCGGGCGGGGGCTCCTCTGTG
W2 GCTGTGCGGTGTCACCTCGCTGTGGGCGCGCTGGCGGGTGGCGCGGGTGGTGGCCGTGCGGCGGGCGGGGGCTCCTCTGTG

A3B TTTCTATTCTCTGTTCCTGTTGACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA.....
2C1 TTTCTATTCTCTGTTCCTGTTGACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA.....
1A1 TTTCTATTCTCTGTTCCTGTTGACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA.....
2G1 TTTCTATTCTCTGTTCCTGTTGACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA.....
W2 TTTCTATTCTCTGTTCCTGTTGACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA.....
    
```

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

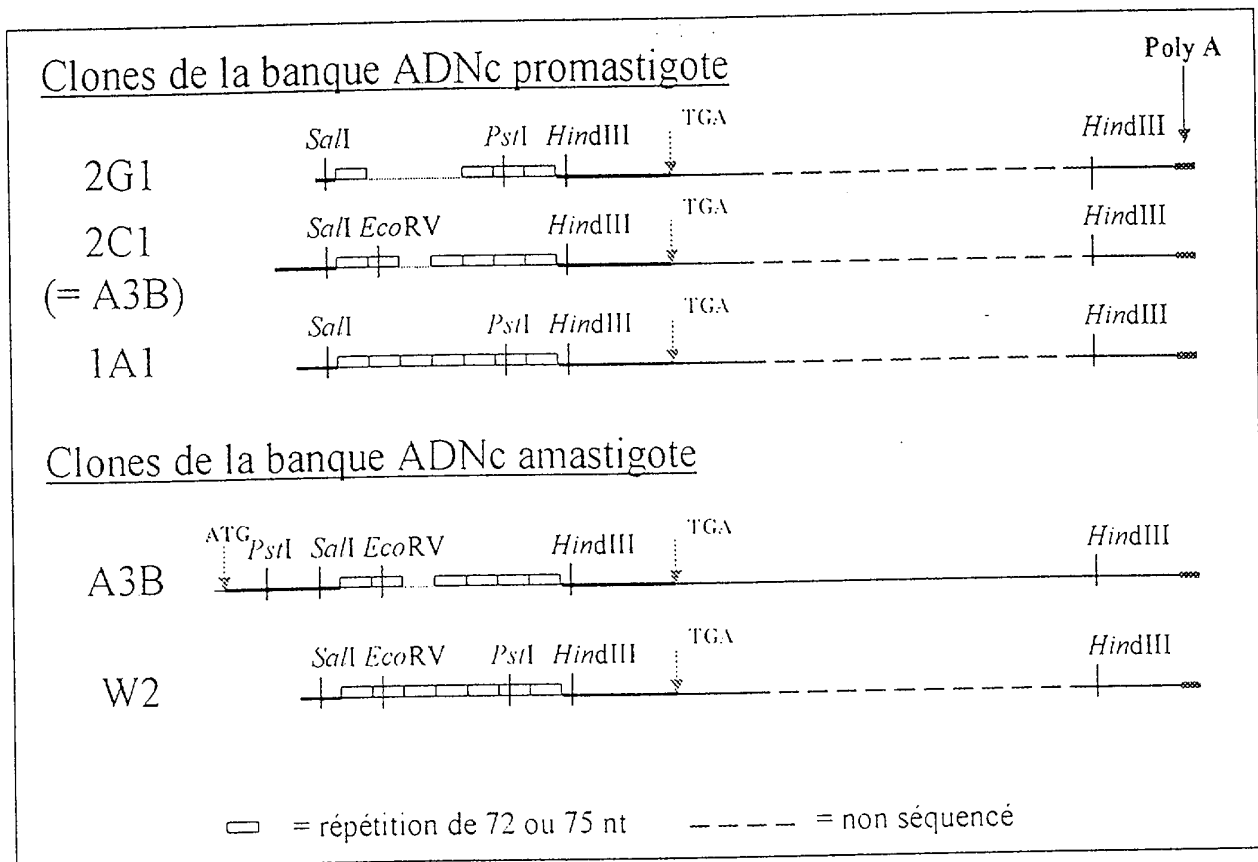
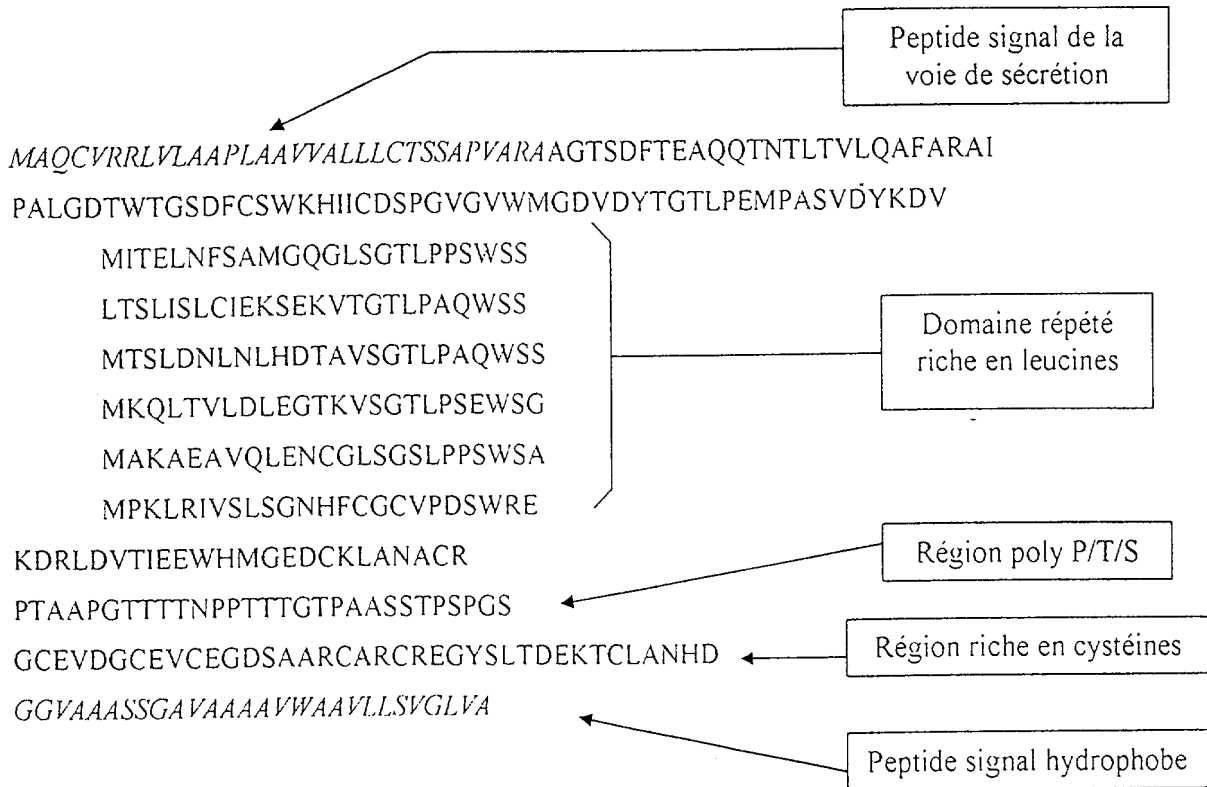
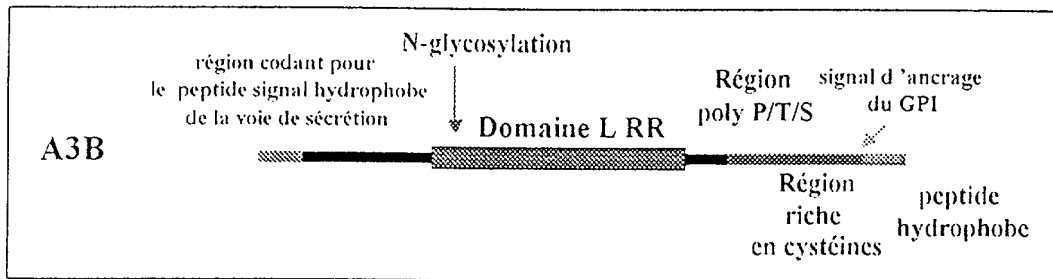


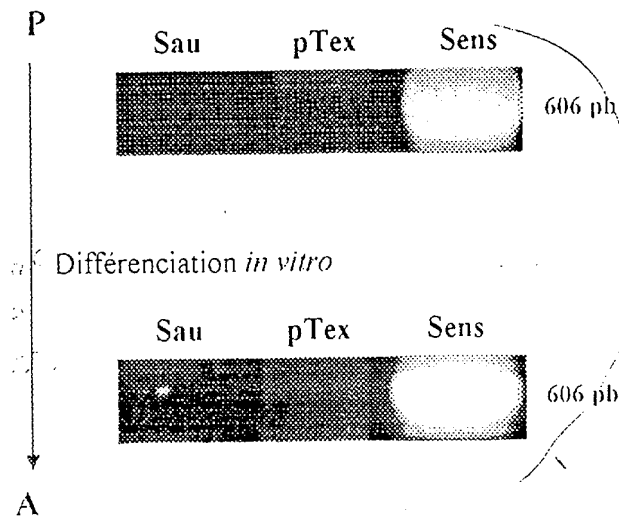
FIGURE 2

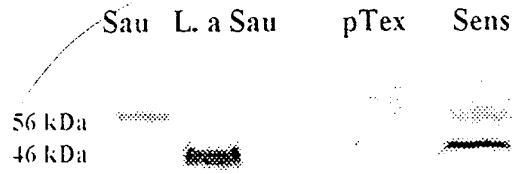


**FIGURE 3A**



**FIGURE 3B**

**FIGURE 4**

-Protéines constitutives

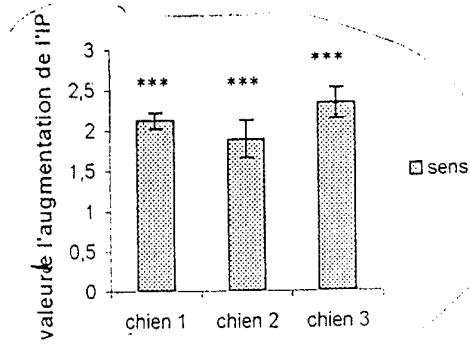
10 µg par piste ; *L. a* : *Leishmania amazonensis*.

-Protéines excrétées/sécrétées

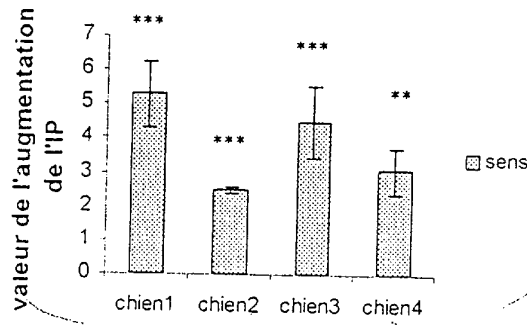
Sau pTex Sens L. a Sau

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 acgctgcctg  
 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 ggtgcgagggt ggatgggtgt gaggtgtgcg  
960

agggggactc cgctgcgcgg tgcgccagggt gccgtgaggg ctactccctg acggacgaga  
1020

agacgtgcct ggccaaccac gatggcgggc tggcggcggc gtcgagcgga gcggtggctg  
1080

ccgctgctgt gtggggcggt gtgctgttga gcgtggggct ggtggcgtga ggggtcggcg  
1140

ggcacacgcy cacgcgcaca cgccgtcgtg catcgcgtgt gctttccgcc gttgtggcgc  
1200

ctgcacggat gcacgggcat gcggaggcgt gcatgcgtgt gcgctgcca gctcttgtgt  
1260

gtctctccgt gtggccagca gtcggcacc cgcgccgatcg aatgtgocg cgccggcggt  
1320

gtgtgcctt ggacagcgga tgcggggccc cgcctcctgc cgtgtgcct gcggtctgct  
1380

gtgctgccc gcgagcgacg tacggatgcy ctgtccggcc ctcttcgacg gggctcgtt  
1440

gcggtgctgt 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 accgcggcgg tgcgggtgcy aggcgggtga tgtgcccgtt gccccccct  
1740

ttcatggcgc gctgggcccga tgcacctott gcctccctcc tccccctccc cctcccgcg  
1800

gtcctgtcaa ttgtatatcc gtggacctta tcttcgtact gcctccgcgc ctcttcgta  
1860

aagcttcgtt ggcgtgtgcc gccccccgga cgtcagcgc gctgtgctcg catgctcag  
1920

gtgcgtcccc gtgcgtgggc gtgcacgtaa ggacatgtat atatgtatgt gtatgtatat  
1980

gagtatgtat atatgtacgg ttatatatag gaatttgtgt atgttgaggt gtatgcatgt  
2040

gcgtgcgtat attagtgtgt gcgagcacgc gtgttgccc acgctctgct gccgcctcc  
2100

gctgtgcgtg tcaactcgtg tgggcgcgggt gccgggtggc gccgggtggt gccggtcgg  
2160



cgggcggggg ctctctgtg 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 cggcggggcg  
2460

gggctctct 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 cgtcatgac 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 taaccgcc accaccaacc gcaccccgag agcctctct actccttctc  
720

cagggtcggg gtgcgaggtg gatgggtgtg aggtgtgca gggggaactcc gctgcgcggt  
780

gcgccagggtg ccgtgagggc tactccctga cggacgagaa gacgtgcgtg gcgaaccacg  
840

atggcggcgt ggcggcggcg tcgagcggag cgggtggctgc cgctgctgtg tggcgcgctg  
900

tgctgttgag cgtggggctg gtggcgtgag ggtgcggcgg gccctcttc tctgtgtg  
960

ccctggtgcc tgccctcgcc cccggcacgg cgctcgtcgt gccctcttc 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 gtcctcct  
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 gcaactggact tcggcgcaat gggccaggga ctgagcggga  
180

cgctgcccc ctcatggagc tcgctgacgt ccttgatgac actgtggatc gaaaagtctg  
240

agaaggtcac cggcacgctg cctaccagc ggagctgat gaagcagctg acccttctgc  
300

atctgaaggc cactaaggctg tccggcacgc tgccgcccga 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 cgctgcgcgc 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 gctgttgagc gtggggctgg tggcgtgagg gtgcggcggc cccctottct  
1020

ctgtggtgcc cctggtgcct gccctgcgcc ccagcacggc gtcgtcgtg cctctcacc  
1080

cccaccagcc gaaggggaga ccgacagcca cacgcacacg cgcacgcgcc gtogtgcac  
1140

gcgtgtgctt tccgccgttg tggcgcctgc gcggatgcac gggcatgcgg aggcgtgcat  
1200

gcgtgtgccc gtgccagctc ttgtgtgtct ctccgtgtgg ccagcagtcg gcacccgcgc  
1260

cgatcgaatg tgcgcgcggc ggcgggtgtg cgcttgagc agcggatgcg gcgcccgcgc  
1320

ctcgcctgtg gccctgcggt ctgctgtgct gccgcgcgag cgacgtacgg agtgcattga  
1380

aggacatgta tatatgatg tgtaggtata tgagtatgta tatatgtacg gttatatata  
1440

ggaatttgtg tatgttgagg tgtatgcatg tgcgtgcgta tattagtctg tgcgagcacg  
1500

cgtgttgccc cacgctttgc tgcccgcctc tgctgtgctg gtcactccct gtgggcgcgc  
1560

tggcgggtgg cgccgggtgg tggcctgccc gcggggcggg gctcctctgt gtttctctat  
1620

ttctctgttc cctgttgacc 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

ttgctaacgc ctgccgccc actgctgctc cgggaacgac 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 tggtgcccct ggtgcctgcc 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

gccttgacaa 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 cactcgctgt 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 caagcttgcct aacgcctgcc  
660

gcccgactgc tgctccggga acgaccacga ctaaccogcc caccaccacc ggcaccccag  
720

cagcctcctc tactccttct ccagggtcgg ggtgcgaggt ggatgggtgt gaggtgtgcg  
780

agggggactc cgctgcgcg tgcgccaggt gccgtgaggg ctactccctg acggacgaga  
840

agacgtgcct ggcgaaccac gatggcgggc tggcgggcgc gtcaagcgga gcggtggctg  
900

cggtctgtgt gtggcgggct gtgctgttga gcgtggggct ggtggcgtga gggtgccgcc  
960

gccccctott ctctgtggg ccctgggtgc ctgccctgc cccagcacg gggctgtgctg  
1020

tgccctctca cccccaccag ccgaagggga gaccgacagc cacacgcaca cgcgcacgcg  
1080

ccgtcgtgca tgcgctgtgc tttccgcccgt tgtggcgccct gcgcggatgc 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 ..... &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>	

1  
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
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		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	
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			

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
-----			