

N° d'ordre: 410

50376
1989
139

50376
1989
139

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES-ARTOIS

Thèse de

Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé

Par

Mahmoud KWEIDER



Rôle d'un antigène majeur de surface (gp65) de
***Leishmania* dans les relations du parasite vis-à-vis de**
son hôte.

Présentée le 8 septembre 1989 devant la commission d'examen

Membres du Jury:	Président	:	Professeur M. PORCHET
	Examineurs	:	Professeur A. CAPRON Professeur A. DHAINAUT Docteur C. MAZINGUE
	Rapporteurs	:	Docteur F. SANTORO Docteur C. AURIAULT

Cette thèse est dédiée à :

mes enfants et à mon épouse,

ma mère,

et à la mémoire de mon père,

modeste témoignage de ma vive affection et de ma profonde reconnaissance.

L'ensemble de ce travail a été réalisé dans le laboratoire du centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de l'INSTITUT PASTEUR de LILLE (Unité Mixte INSERM U 167 CNRS 624) sous la direction du Professeur A.CAPRON. Membre de l'Académie de science.

REMERCIEMENTS

Je voudrais, très sincèrement, exprimer à Monsieur le Professeur A. CAPRON, ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ce travail.

A mon Président de jury de thèse,

Monsieur le Professeur M. PORCHET.

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Je vous remercie d'avoir bien voulu consacrer une partie de votre précieux temps pour l'analyse de ce travail.

Veillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur A. DHAINAUT,

Je vous suis particulièrement reconnaissant d'avoir bien voulu
accepter de juger cette thèse.

Je voudrais exprimer, à Monsieur le Docteur F.SANTORO, ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son équipe de protozoologie où j'ai réalisé la première partie de mon travail. Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je désirerais exprimer mes sentiments les plus sincères à mon responsable de recherche, Monsieur le Docteur Claude AURIAULT, pour la rigueur de son encadrement et l'établissement des relations très amicales entre nous.

Je remercie très vivement, Mme le Docteur C. MAZINGUE, qui m'a beaucoup aidé à la réalisation de cette thèse, je lui en suis très reconnaissant.

Je remercie très sincèrement Jean-loup LEMESRE , Françoise DARCY et Farrukh RIZVI pour toute l'aide qu'elle m'ont apporté au cours de mon travail, je leur exprime ici toute ma gratitude.

Je rends un hommage particulier à toutes celles et à tous ceux qui m'ont apporté leur aide, de près ou de loin, dans la réalisation de ce travail, notamment à I. WOLOWCZUK, F. COTTREZ-DETOEUF, M. DEMONNEVILLE, D. DESLEE, M. LOYENS, C. COLSON, M.F. MASSARD, J. DERICK ainsi que l'ensemble de personnels des groupes IRRI et TOXO.

LISTE DES PUBLICATIONS

Ce travail a fait l'objet des publications suivantes:

1. LEMESRE.J.L., DARCY.F., KWEIDER.M., CAPRON.A. & SANTORO.F. (1988) Requirements of defined cultivation conditions for standard growth of *Leishmania* promastigotes *in vitro*. *Acta. Tropica* **45**: 99-108.
2. KWEIDER.M., LEMESRE.J.L., DARCY.F., KUSNIERZ.J.P., CAPRON.A. & SANTORO.F. (1987) Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65,000-dalton surface antigen. *J.Immunol.* **138**: 299-305.
3. KWEIDER.M., LEMESRE.J.L., SANTORO.F., KUSNIERZ.J.P., SADIGURSKY. M. & CAPRON.A. (1989) Development of metacyclic *Leishmania* promastigotes is associated with the increasing expression of GP65, the major surface antigen. *Parasit.Immunol.* **11**: 197-209.
4. KWEIDER.M., MAZINGUE.C., COTTREZ-DETOEUF.F., CAPRON.A. & AURIAULT.C. (1989) Analysis of the immune response in immunized BALB/c mice with the major surface antigen of *L. amazonensis* promastigotes. (submitted for publication).
- *5. MAZINGUE.C., COTTREZ-DETOEUF.F., LOUIS.J., KWEIDER.M., AURIAULT. C. & CAPRON.A. (1989) *In vitro* and *in vivo* effects of interleukin 2 on the protozoan parasite *Leishmania*. *Eur.J.Immunol.* **19**: 487.

- *6. SANTORO.F., KWEIDER.M., Lemesre J.L., Darcy F. & Rizvi F.S. (1987)
Infectivity of *Leishmania* promastigotes is dependent on the
expression of A 65,000 Dalton surface antigen. in Chang K.P. and
Snary D.(Eds), Molecular and cellular interactions in *protozoal
infections*. NATO ASI Ser., Vol. 171. Springer-Verlag, Berlin
Heidelberg. P: 117.

* Ces publications n'ont pas été incluses dans ce mémoire.

RESUME

RESUME

Plusieurs auteurs ont démontré l'existence d'un antigène majeur de surface de *Leishmania* de 65 kDa. L'objectif de notre travail était d'étudier le rôle de cet antigène dans l'infectivité des promastigotes de *Leishmania in vitro*, et d'analyser la réponse immunitaire suscitée chez la souris vis-à-vis de la gp65. Ainsi, en utilisant des cultures de *Leishmania* bien standardisées *in vitro*, nous avons mis en évidence *in vitro* et *in vivo* un développement séquentiel de l'infectivité des promastigotes de *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*. L'apparition des formes infectieuses de promastigotes est associée à l'expression croissante de la gp65, et restreinte aux organismes de la phase stationnaire de culture. Le mécanisme de l'expression croissante de la gp65 est applicable à toutes les espèces responsables de leishmanioses cutanées ou mucocutanées du nouveau monde. Nous avons également démontré que la gp65 joue un rôle central dans l'infection, notamment dans la survie intracellulaire du parasite.

Dans un deuxième temps, nous avons procédé à la purification de la gp65 de promastigotes de *L. amazonensis*, et à l'étude chez la souris de la réponse immunitaire contre cet antigène. Des lymphocytes T anti-gp65 prélevés chez un animal immunisé et transférés immédiatement à des souris syngéneiques infectées par *L. amazonensis* induisent un niveau appréciable de protection. Le transfert de lignées T anti-gp65 maintenues 3 semaines en culture entraîne au contraire une exacerbation des lésions alors que le transfert de sérums anti-gp65 n'a pas d'effet sur l'infection.

Ces résultats confirment d'une part la prévalence des mécanismes à médiation cellulaire dans l'établissement d'une immunité protectrice contre la leishmaniose et renforcent d'autre part le choix de la gp65 comme antigène potentiellement vaccinant. Néanmoins, les conditions d'expérimentation pouvant conduire avec cet antigène à une protection ou à son contraire, l'analyse de ces phénomènes permettra de déterminer les conditions optimales d'utilisation de cet antigène en vue d'obtenir une protection.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les maladies parasitaires, affectant plusieurs centaines de millions d'individus, représentent à l'échelle mondiale un problème préoccupant de santé publique, tant par leur morbidité voire par leur mortalité, que par leur retentissement sur le potentiel de développement des pays du tiers monde.

La persistance et le développement de ces maladies parasitaires résultent des conditions de vie et d'hygiène souvent insuffisantes, ainsi que d'une efficacité limitée des moyens de lutte.

Ces derniers pourront intervenir à deux niveaux :

- soit en agissant sur le vecteur de transmission de la maladie.
- soit en agissant directement sur l'agent causal de la maladie : le parasite.

Cependant, l'utilisation de pesticides onéreux peut entraîner des modifications de l'écosystème, parfois même une résistance du vecteur. De plus, si l'emploi de médicaments antiparasitaires est efficace dans le cadre d'une infection actuelle, il ne peut en aucun cas prévenir d'une réinfection.

Cet état de fait rend l'étude immunologique approfondie des maladies parasitaires indispensable pour mieux comprendre les relations hôte-parasite, les mécanismes de défense de l'hôte contre le parasite ou les raisons pour lesquelles ces mécanismes ont une efficacité limitée, suscitant ainsi de nouveaux axes de recherche qui ont pour but la création de vaccins efficaces contribuant à l'éradication des parasitoses. Une de ces parasitoses qui a fait l'objet de notre travail est la **leishmaniose**.

Les leishmanies représentent un ensemble de parasites protozoaires responsables de certaines maladies cutanées, cutanéomuqueuses ou viscérales chez l'homme. Les leishmanioses sont une cause importante de mortalité dans divers pays du tiers monde. On estime le nombre de personnes atteintes par les différentes formes de leishmanioses dans le monde à 12 millions d'individus et 400.000 nouveaux cas sont déclarés chaque année à l'O.M.S. Le cycle parasitaire comprend une forme flagellée, **promastigote**, chez l'insecte

vecteur et un stade non flagellé, **amastigote**, chez les mammifères. Comme dans la toxoplasmose, les sujets infectés par les leishmanies conservent en général une bonne protection contre la réinfection. Ainsi dans certaines régions du Moyen-Orient, une "vaccination" contre la leishmaniose cutanée peut être obtenue par inoculation d'une dose infectieuse de parasites dans une région choisie du corps de façon à empêcher l'apparition des lésions naturelles à la face. Après la guérison de la lésion, une solide immunité est ainsi conférée au patient.

Les travaux en immunologie parasitaire s'orientent actuellement autour de deux grands axes permettant de mieux comprendre les mécanismes de la relation du parasite avec son hôte :

- d'une part la définition et l'étude des antigènes de surface du parasite.
- d'autre part l'analyse des mécanismes d'interaction entre le parasite et l'hôte infecté.

Dans le cas de la leishmaniose, des travaux préliminaires ont suggéré un rôle des antigènes de surface dans les interactions de ce parasite avec son hôte et plus précisément avec sa cellule cible obligatoire : le macrophage (Adler R.S., 1964).

Le but de notre travail était de caractériser les antigènes de surface de *Leishmania*, cibles de mécanismes immunitaires effecteurs, et d'étudier la réponse immunitaire vis-à-vis de ces antigènes; nous avons donc abordé notre travail en deux principaux volets :

a-) Tout d'abord, nous avons essayé de mettre en évidence une modification de l'infectivité des promastigotes de *L. braziliensis* au cours de leur maturation en culture vis-à-vis de macrophages péritonéaux de souris puis d'établir s'il existe une corrélation entre l'apparition des formes infectantes et d'éventuelles modifications de l'expression des antigènes de surface du parasite. Il est important de noter que dans le cas des leishmanies en général, on relève dans la littérature un certain nombre de résultats discordants provenant d'expériences utilisant des cultures mal contrôlées avec notamment des concentrations de parasites dans l'inoculum et des volumes de milieux non définis au moment de la mise en culture. C'est la raison pour laquelle préalablement à notre étude proprement dite, nous avons effectué un travail de standardisation des cultures de promastigotes de différentes

espèces de leishmanies. Ensuite nous avons élargi cette étude aux autres espèces de leishmanies du nouveau monde, responsables de leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses. Pour cela, nous avons utilisé comme modèle expérimental des souris BALB/c infectées par *L. amazonensis*, responsable de la leishmaniose cutanée.

Cette première partie de notre travail visait à :

- 1-) Caractériser les composants de surface des diverses espèces de leishmanies.
 - 2-) Développer des méthodes *in vitro* permettant d'étudier le rôle de certains de ces composants dans l'infectivité des promastigotes.
- b-) Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'étude du rôle de l'antigène majeur de surface, qui est une **glycoprotéine de 65KDa**, nommée gp65, dans l'induction de l'immunité à médiation cellulaire, et à la définition du rôle *in vivo* des lymphocytes T spécifiques de cet antigène de promastigote de *L. amazonensis* ainsi que celui éventuel de lymphokines produites *in vitro* par ces cellules T, sur des macrophages infectés.

GENERALITES

GENERALITES

1. NOTIONS DE PARASITOLOGIE .

Les leishmanies sont des flagellés endocellulaires de la famille des trypanosomatidae qui, par leur présence dans les cellules du système réticulo-histiocytaire de l'homme, sont responsables des diverses formes de leishmanioses. La parfaite identité morphologique et biologique entre les différentes espèces de leishmanies permet de penser qu'il s'agit très vraisemblablement d'une espèce parasitaire unique mais en voie de différenciation, dont plusieurs souches se sont individualisées au point d'acquérir des expressions cliniques et épidémiologiques différentes.

Ces parasites, probablement découverts d'abord par Cunningham en 1885 dans le "bouton d'orient", ne sont bien connus que depuis les descriptions données par Leishman et Donovan en 1903. Chez les animaux, les leishmanies ont été signalées d'abord chez le chien (Nicolle et Comte, 1908) qui dans certains pays est souvent infecté. Ces parasites vivent électivement dans les cellules du système réticulo-histiocytaire, soit de la peau et des muqueuses, soit des organes profonds (foie, rate, moelle osseuse) (Jacquemin P. et Jacquemin L., 1980). Les leishmanies représentent un complexe de parasites protozoaires responsables de différentes leishmanioses, cutanée, cutanéomuqueuse et viscérale chez l'homme.

1-1. Taxonomie.

Les leishmanies étaient préalablement caractérisées par leur existence sous deux formes, promastigote dans le système digestif de l'insecte vecteur, et amastigote dans les cellules de leur hôte vertébré. Le manque de paramètres biologiques classiques permettant une identification sûre et correcte, avait laissé plusieurs problèmes médicaux et épidémiologiques en suspens (Chance M.L *et al.*, 1974).

L'utilisation de méthodes sérologiques plus perfectionnées a permis de classer d'une manière logique les différents types de leishmanies (Bray R.S., 1970).

L'analyse des antigènes de surface à l'aide d'antisérums polyclonaux ou d'anticorps monoclonaux a été utilisée pour distinguer des espèces, sous-espèces et souches de leishmanies (McMahon-Pratt D. et David J.R., 1981) (MacMahon-Pratt D. *et al.*, 1982); ces mêmes réactifs immunologiques ont permis de démontrer par ailleurs que plusieurs espèces de leishmanies présentent certains antigènes communs ou des réactions antigéniques croisées (Handman E. et Hocking R.E., 1982) (Lepay D.A. *et al.*, 1983).

Les caractéristiques chimiques et la distribution géographique qui ont été utilisées pour la classification des leishmanies se sont révélées insuffisantes; c'est pourquoi de nombreuses études ont été réalisées afin de trouver d'autres critères d'identification des souches et de définition des espèces et sous-espèces de leishmanies.

Récemment, des lectines ont été utilisées pour étudier les structures membranaires; ces protéines végétales, qui se lient aux résidus glycosylés de la surface cellulaire (Goldestin I.J. *et al.*, 1980), peuvent être utilisées pour identifier différentes espèces de protozoaires (Araujo F.G. *et al.*, 1980) y compris les leishmanies (Scholletins J. 1982). La classification connue actuellement est celle qui est faite en fonction des manifestations cliniques qu'elles entraînent et des correspondances épidémiologiques. Les agents de la maladie et les différentes formes des leishmanioses, leur répartition géographiques ainsi que leur traitements sont présentés dans le tableau (I).

1-2. CYCLE EVOLUTIF .

1-2-1. Cycle évolutif chez l'hôte intermédiaire.

Le cycle évolutif nécessite l'intervention, comme hôte intermédiaire et vecteur, d'un petit moustique, le phlébotome (en anglais "sandfly"), diptère nématocère de la famille des psychodidés (*P. argentipes*, *P. perniciosus*, *P. ariasi*). Etant donnée sa faible taille (1,5 à 3

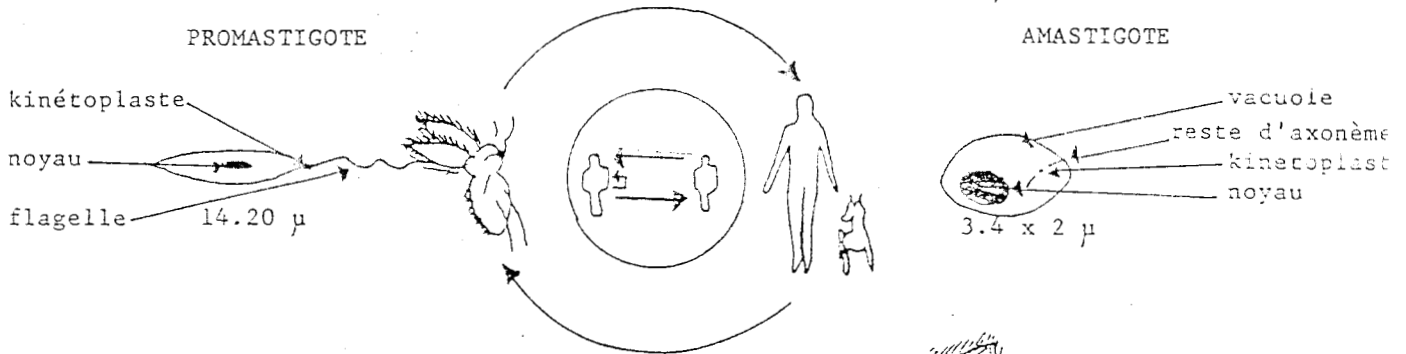
mm), il passe à travers les mailles des moustiquaires classiques. Seule la femelle est hématophage; sa pique est surtout nocturne et provoque une douleur. Elle absorbe le sang parasité de l'hôte définitif qui contient des amastigotes. Ces amastigotes, arrivés dans l'intestin, se transforment en promastigotes, fuseaux allongés d'environ 15 μ m, à flagelle libre aussi long que le corps, qui se multiplient activement par division binaire. Vers le 6^{ème} jour, ils remontent vers le pharynx dont ils bloquent le passage. Quant l'insecte pique l'homme ou le chien, hôtes définitifs, il y a régurgitation d'une partie du repas sanguin qui contient des leishmanies, et donc transmission de la forme infestante. Le phlébotome reste infesté toute son existence (Brumpt E., 1949) (Jacquemin M. et Jacquemin L., 1980) (Hommel M., 1978).(Figure 1).

TABLEAU I : CLASSIFICATION ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES LEISHMANIOSES, AINSI QUE LEUR VECTEUR ET TRAITEMENT

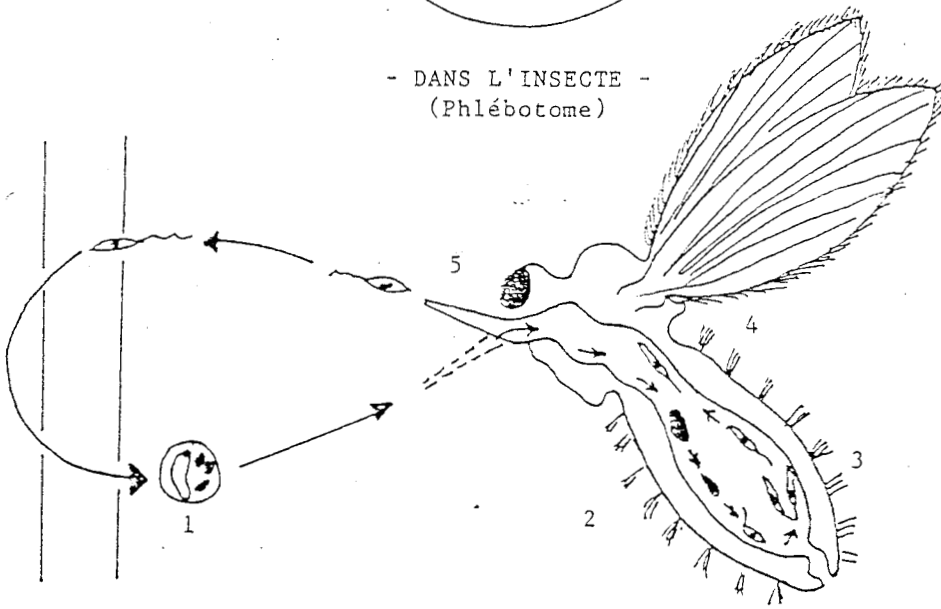
	ESPECES	CLINIQUE	INSECTE VECTEUR PRINCIPAL	REPARTITION GEOGRAPHIQUE	TRAITEMENT
Leishmanose de l'Ancien Monde	<i>L. infantum</i>	L. viscérale infantile	<i>P. perniciosus</i>	Bassin méditerranéen	} Glucantine et Lomidine
	<i>L. donovani</i>	L. viscérale (Kala-azar)	<i>P. argentipes</i>	Inde	
	<i>L. tropica</i>	L. cutanée sèche	<i>P. papatasi</i>	M-Orient & Afr. du Nord	} Glucantine
	<i>L. major</i>	L. cutanée humide	<i>P. sergenti</i>	Asie Centrale	
	<i>L. aethiopica</i>	L. cutanée localisée ou diffuse	<i>P. sergenti</i>	Ethiopie	
Leishmaniose du Nouveau-Monde	<i>L. chagasi</i>	proche de <i>L. infantum</i>	<i>P. argentipes</i>	Amérique du Sud	} Glucantine
	<i>L. mexicana</i>		<i>P. intermedia</i>	Mexique, Guatemala	
	<i>L. amazonensis</i>	L. cutanée localisée	<i>P. olmeca</i>	Brésil, Colombie	} et Lomidine
	<i>L. pifanoi</i>	ou diffuse	<i>P.f. laviscutellata</i>	Vénézuéla	
	<i>L. braziliensis</i>	L. cutanée pure ou	<i>P. intermedius</i>	Brésil	} Glucantine ou la Fungizone
	<i>L. guyanensis</i>	cutané-muqueuse	<i>P. olmeca</i>	Guyane	
	<i>L. panamensis</i>	(Espundia, pian-bois)	<i>P. papatasi</i>	Panama	
	<i>L. peruviana</i>	L. cutanée (surtout UTA)	<i>P. papatasi</i>	Pérou	

CYCLE EVOLUTIF ET MORPHOLOGIE DES LEISHMANIES

D'après "Medical Parasitology, Tropical Medical Microbiology course", 1976

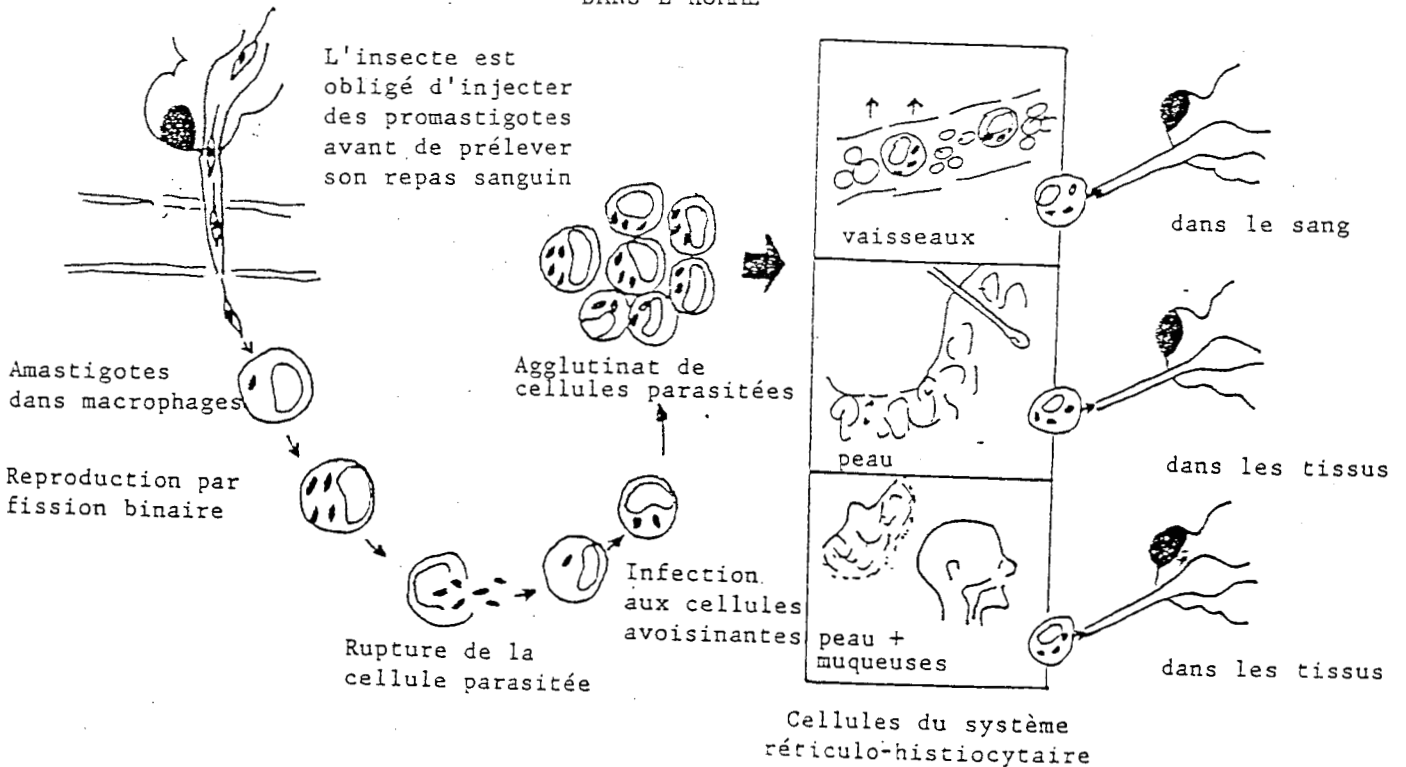


- DANS L'INSECTE -
(Phlébotome)



- (1) Amastigotes dans le sang ou le tissu
- (2) Transformation en promastigotes
- (3) Reproduction par fission binaire
- (4) Migration vers le pharynx
- (5) Blocage du proboscis par promastigotes

- DANS L'HOMME -



1-2-2. Cycle évolutif chez l'hôte définitif.

En dehors de l'hôte définitif humain, le cycle est entretenu par un important réservoir animal de parasites, tant sauvage (rongeurs, chacal, renard) que domestique (chien), variable selon les régions.

Lorsque l'hôte définitif est piqué par le phlébotome infesté, les promastigotes régurgités dans les téguments de ce dernier, sont immédiatement phagocytés par les éléments du système réticulo-histocytaire au sein desquels ils deviennent amastigotes. Les cellules du système réticulo-histocytaire (SRH) remplies d'amastigotes, éclatent et libèrent ces derniers qui vont réinfester d'autres cellules du SRH.

2. Le diagnostic des Leishmanioses.

2-1. La Leishmaniose viscérale :

Seule la mise en évidence de *Leishmania donovani* permet d'affirmer le diagnostic de kala-azar. Théoriquement, c'est dans la moelle osseuse, le foie, la rate et les ganglions que peuvent être découverts les parasites par ponction de ces organes. Le produit de la ponction, coloré au Giemsa, assure le diagnostic s'il révèle des leishmanies libres ou incluses dans les éléments cellulaires. On peut encore cultiver les prélèvements réalisés dans des milieux contenant du sang, ou inoculer des animaux, en particulier le hamster.

Une des caractéristiques biologiques les plus curieuses des leishmanioses viscérales est l'élévation très importante des immunoglobulines dans le sérum.

2-2. Le diagnostic biologique des leishmanioses cutanées.

Le diagnostic de certitude repose sur l'identification des *Leishmania*. La recherche des parasites se fait à l'examen direct des sérosités recueillies au fond de l'ulcération ou à la périphérie des lésions cutanées et sur les coupes histologiques, en prélevant un petit fragment de lésion que l'on écrase entre deux lames.

En dehors de l'intradermoréaction de Montenegro, il n'y a pas de test qui puisse fournir une aide au diagnostic. Il n'y a pratiquement pas d'anticorps spécifiques et pas non plus d'élévation des immunoglobulines comme dans les formes viscérales.

L'immunofluorescence donne une réaction de groupe. Le diagnostic d'espèce est impossible. L'immunofluorescence n'est en fait utilisée que pour le diagnostic de la leishmaniose viscérale (kala-azar) où les titres obtenus sont élevés. Elle est inutilisable et inutile dans le cas de Bouton d'Orient. Elle est néanmoins possible pour le diagnostic des formes cutanées à ulcérations multiples d'Amérique dans lesquelles les taux trouvés sont élevés. L'immunofluorescence ne peut rendre compte d'un état d'immunité, les anticorps disparaissant très rapidement après guérison.

3. Culture des Leishmanies.

Il est admis actuellement que la mise au point de la technique de culture standardisée des Leishmanies est indispensable tant pour les laboratoires de diagnostic que pour la meilleure connaissance des relations hôte-parasite en recherche fondamentale. Les premiers milieux utilisés avec succès étaient des milieux biphasiques "agar au sang" comme le milieu NNN (Novy et Mc Neal., 1904) (Nicolle.,1908) qui conviennent très bien aux parasites mais présentent certains inconvénients; mal définis, ils interdisent toute réelle standardisation, et ne permettent pas une séparation facile des promastigotes des particules de la phase solide, ce qui est gênant pour les études biochimiques ou antigéniques ultérieures (Marin F. *et al.*,1982).

Actuellement, ces milieux biphasiques ne sont plus employés que lors de la première mise en culture de souches isolées de patients ou d'animaux. En effet, plus récemment, des milieux monophasiques mieux définis ont été utilisés pour la culture des leishmanies, tel le milieu, composé principalement de (glucose, lactalbumine hydrolysée, sérum, hémoglobine), GLSH développé et utilisé par Le Ray et Jadin (1969, 1974).

- La mise au point de ces techniques de standardisation des cultures de parasites a permis de montrer une corrélation entre l'âge des promastigotes en culture et leur niveau d'infectivité (Giannini M.S., 1974).

En effet, dans le cas de *Leishmania donovani*, Giannini a montré que les promastigotes provenant de culture en phase exponentielle sont moins infectieux *in vivo* pour le hamster que ceux provenant de culture en phase stationnaire.

Par ailleurs, il a été démontré *in vitro* que les formes tardives semblent être les seules formes capables d'infecter les macrophages et de s'y multiplier (Akiyama H.J. et Haight R.D., 1971).

En fait, ces différences d'infectivité peuvent être expliquées par des modifications au niveau du parasite :

a-) Modifications fonctionnelles et morphologiques: les formes observées dans l'intestin puis le pharynx de l'insecte vecteur ne sont pas les mêmes (Killick-Kendrick R., 1979).

b-) Modifications biochimiques et antigéniques de la surface des promastigotes (Rizvi, F.S. *et al.*, 1985) (Sacks D.L. *et al.*, 1985).

4. Les modèles animaux utilisés dans la leishmaniose expérimentale.

Les animaux utilisés comme modèles d'infection de laboratoire sont les suivants :

- 1-) Le cochon d'inde infecté par *L. enriettii* .
- 2-) Le hamster infecté par *L. braziliensis*; *L. mexicana* et *L. amazonensis*
- 3-) La souris infectée par *L. major*, *L. mexicana* ou *L. amazonensis* .

La plupart des études expérimentales ont été réalisées chez la souris. Les modèles les plus utilisées sont *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana* et *L. amazonensis* qui induisent des leishmanioses cutanées dont on peut aisément suivre l'évolution *in vivo*. Les souris sont infectées par injection de parasites dans les coussinets plantaires. L'évolution de l'infection peut être suivie par la mesure du gonflement de la patte infectée ainsi que par un dénombrement des parasites au niveau de la lésion cutanée. Il est important de noter que la sévérité de la leishmaniose chez la souris est très variable selon la souche de souris. Ainsi, beaucoup de souches de souris sont résistantes à l'infection par *Leishmania* comme les souris C57BL/6; ces souris commencent par présenter des lésions mais cette phase est suivie d'une régression de la maladie ou de la lésion conduisant à la guérison et à l'instauration d'une immunité protectrice permanente.

D'autres souches de souris, comme les BALB/c, sont très susceptibles à l'infection par *Leishmania* et dans plusieurs cas l'infection locale se viscéralise conduisant à la mort de la souris (Bradley D.J., 1974) (Bradley D.J. et Kirkley J., 1977) (Howard J.G. *et al.*, 1980).

Les différences observées dans la réponse immunitaire suivant les souches de souris permettent de penser que la résistance ou la susceptibilité à l'infection par *Leishmania* est liée à un facteur génétique. Howard *et al* ont démontré l'existence d'un gène (Lsh) non associé au complexe majeur d'histocompatibilité (H-2) et responsable de ce contrôle (Howard J.G. *et al.*, 1980).

5. L'immunité dans la Leishmaniose.

Divers travaux ont été effectués durant la dernière décennie faisant progresser les connaissances sur les mécanismes immunitaires mis en jeu au cours de la leishmaniose. Malgré l'importance des informations accumulées jusqu'à présent, un consensus sur les mécanismes de protection immunitaire dans cette maladie très complexe n'est pas encore obtenu.

5-1. La réponse immunitaire dans les Leishmanioses humaines.

5-1-1. L'immunologie des Leishmanioses viscérales.

L'infection à *Leishmania donovani* reste, sur le plan immunologique, difficile à comprendre. En effet, si après la guérison d'une Leishmaniose, que cette guérison ait été obtenue naturellement ou sous l'effet du traitement, le malade devient résistant pour la vie à toute réinfection par le même parasite, le support de cette résistance reste difficile à préciser. Malgré une augmentation du taux d'immunoglobulines notamment de type IgG au cours de l'infection par *Leishmania donovani*, ces anticorps n'ont aucune activité protectrice anti-parasitaire.

5-1-2. L'immunologie des Leishmanioses cutanées.

On a remarqué depuis très longtemps que les Leishmanioses guérissant spontanément (et maintenant celles qui le font sous traitement) entraînent une résistance définitive pour la vie entière du malade vis-à-vis des infections par le même parasite. On pense que cette résistance s'explique par le développement d'une immunité de type cellulaire. L'hypersensibilité de type retardée est mise en évidence au cours de la réaction de Montenegro en utilisant un antigène préparé à partir d'une culture de *Leishmania* et injecté par voie intradermique. Cette réaction se positive en quelques semaines dans le classique bouton d'orient; en revanche, elle ne se positive que très lentement dans les formes cutanéomuqueuses. L'intradermoréaction ne devient positive dans l'espundia qu'au terme de plusieurs années d'évolution à la période terminale et mutilante de la maladie.

Les infections par *Leishmania tropica* sont habituellement limitées à une lésion unique ou à un très petit nombre de lésions. Ce n'est que très rarement que les ulcères cutanés d'une leishmaniose se dispersent sur tout le corps pour réaliser la leishmaniose diffuse, et on estime que cette généralisation des lésions est la conséquence d'une défaillance

dans l'établissement d'une immunité de type cellulaire chez un hôte anergique au parasite.

Ainsi, les lésions des Leishmanioses s'étageraient entre deux états extrêmes, d'hypersensibilité d'une part, le bouton d'orient, et d'anergie d'autre part, la Leishmaniose cutanéomuqueuse.

Il apparaît donc évident que le caractère le plus important dans la réponse immunitaire de l'homme contre une infection par *L. tropica* est le développement des réactions à médiation cellulaire.

La démonstration du rôle de la réponse humorale dans la Leishmaniose cutanée n'est pas aussi claire que la réponse cellulaire. Les résultats obtenus par immunofluorescence suggèrent que les anticorps peuvent être présents, bien qu'en faible quantité, dans la Leishmaniose cutanée de l'ancien monde (Behforouz N. *et al.*, 1976), et que leurs titres augmentent avec la sévérité de la maladie (Menzel S. et Bienzle U., 1978). L'infection par les parasites de *L. braziliensis* suscite une réponse immunitaire cellulaire et humorale (Shaw J.J. et Lainson R., 1975).

5-2. La réponse immunitaire dans la Leishmaniose expérimentale.

La plupart des études sur les leishmanioses cutanées ont été réalisées sur deux modèles animaux, le cochon d'Inde infecté par *L. enriettii* et la souris infectée par *L. major*, *L. mexicana* ou *L. amazonensis*. D'autre part, l'utilisation du hamster comme modèle d'infection de laboratoire par *L. braziliensis*, *L. mexicana* et *L. amazonensis* a été bien établie.

5-2-1. Rôle du macrophage.

La caractéristique la plus significative des Leishmanies est leur dépendance absolue vis-à-vis des cellules phagocytaires du système réticulo-histocytaire, dans lesquelles elles vivent et se multiplient. Il semble néanmoins qu'il y ait eu au cours de l'évolution une adaptation des parasites leur permettant de survivre à l'intérieur de cellules normalement

responsables de l'élimination des agents indésirables dans l'organisme.

Plusieurs mécanismes ont été rapportés afin d'expliquer la survie intracellulaire de *Leishmania* dans les macrophages:

a-) Divers travaux réalisés sur les interactions *Leishmania*-macrophage ont démontré que ces parasites vivent à l'intérieur de phagolysosomes; ainsi, il a été constaté chez différentes espèces de *Leishmania* que le phagosome, qui contient le parasite dans le macrophage, se fusionne avec les lysosomes formant le phagolysosome sans que le parasite soit dégradé par les enzymes lysosomales. Cela suggère une certaine insensibilité des parasites à ces enzymes (Alexander J. *et al.*, 1975) (Berman J.D. *et al.*, 1979).

b-) Il semble que les amastigotes de *Leishmania* ne soient pas affectés par le milieu intra-phagolysosomal et puissent proliférer dans cet environnement. Cette résistance d'amastigotes aux enzymes lysosomales est partielle; en effet, le traitement de macrophages infectés par *L. mexicana* avec des agents inhibiteurs de la fusion phagosome-lysosome favorise la croissance de ces parasites intracellulaires (Alexander J., 1981). Les promastigotes seraient plus sensibles aux enzymes lysosomales que les amastigotes; ainsi, il a été suggéré que la survie de promastigotes à l'intérieur de macrophages dépende de leur capacité à se transformer rapidement en amastigotes (Lewis D.H. *et al.*, 1977).

c-) D'autres études ont suggéré que les parasites de *Leishmania* sécrètent eux-mêmes des substances inhibitrices de l'activité enzymatique lysosomale; ainsi, un facteur sécrété-excrété (EF) a été décrit comme capable de protéger ces parasites de la dégradation intracellulaire (Handman E. *et al.*, 1977).

Cependant, une fois l'infection établie, de nouveaux facteurs interviennent et jouent un rôle important dans l'infection. L'élément majeur de défense de l'hôte est la capacité d'élaborer une réponse immunitaire capable d'activer les macrophages et conduisant à la destruction intracellulaire des parasites.

L'association entre la résistance de l'hôte vis-à-vis d'une infection et la capacité des macrophages à lyser les *Leishmanies in vitro* suggère que les macrophages sont des cellules effectrices importantes dans la défense contre ces agents pathogènes.

En effet, il a été démontré qu' on ne trouve pas de formes parasitaires extracellulaires lors de la guérison, et les formes dégénérées sont observées à l'intérieur des macrophages suggérant ainsi que les parasites sont tués à l'intérieur des cellules (Sordat B. *et al.*, 1977).

5-2-2. Réponse humorale.

Différentes études ont permis d'établir que l'immunité humorale ne joue pas un rôle fondamental dans l'instauration d'une immunité protectrice bien que l'infection soit accompagnée d'une élévation du titre d'anticorps (Hale C. *et al.*, 1981) (Howard R.J. *et al.*, 1982) (Howard J.G. *et al.*, 1984).

Chez le cochon d'Inde infecté par *L. enriettii* et la souris infectée par *L. tropica*, *L. amazonensis* ou *L. mexicana*, les anticorps peuvent être détectés par immunofluorescence 2-3 semaines après l'infection (Bryceson A.D.M. *et al.*, 1972) (Preston P.M. *et al.*, 1972). Par ailleurs, le transfert de sérum immun s'avère incapable de conférer une protection (Rezai H.R. *et al.*, 1980) (Howard J.G. *et al.*, 1981).

Malgré toutes ces observations, un rôle de l'immunité humorale dans la résistance contre les Leishmanies ne peut pas être entièrement exclu, d'autant plus qu' aucun modèle expérimental n' a été développé jusqu' à présent dans lequel une guérison de la leishmaniose ait pu être observée en absence d'anticorps circulants.

5-2-3. Réponse immunitaire à médiation cellulaire.

Contrairement à l'immunité humorale, plusieurs travaux ont montré que les populations lymphocytaires T jouent un rôle important dans la réponse immunitaire de souris contre une infection par *Leishmania* .

5-2-3-1. Existence de cellules T "protectrices".

Le rôle majeur de lymphocytes T est supporté par les observations suivantes:

- a-) Des souris CBA et C57BL, naturellement résistantes, deviennent totalement incapables de contrôler une infection de *L. major* après thymectomie. Néanmoins, une résistance normale peut être restaurée par le transfert de cellules T syngéniques (Mitchell G.F. *et al.*, 1981)
- b-) Une protection contre une infection par *L. donovani* ou *L. major* peut être obtenue chez des souris sensibles par le transfert de lymphocytes T provenant de souris présentant une résistance acquise après infection. Le transfert de sérums de ces souris est incapable de conférer cette immunité protectrice (Rezai H.R. *et al.*, 1980) (Liew F.Y. *et al.*, 1982).
- c-) Des souris C3H, naturellement résistantes, traitées dès la naissance par des anticorps anti-IgM deviennent déficientes en réponse anticorps et sensibles à l'infection par *L. major*. Cependant, la restauration d'une résistance est obtenue par le transfert de lymphocytes T de souris syngéniques C3H normales sans aucune restauration de la réponse anticorps (Scott P. *et al.*, 1986). Toutes ces observations soulignent l'importance de la réponse immunitaire à médiation cellulaire dans l'établissement d'une résistance contre la leishmaniose.

Il semble qu'il y ait actuellement un consensus général sur le fait que les cellules T protectrices soient de phénotype CD4⁺. Cette constatation est supportée par des études expérimentales réalisées dans différents laboratoires; ces études ont démontré que les cellules CD4⁺ seraient protectrices grâce aux lymphokines qu'elles produisent tel que le facteur d'activation du macrophage (MAF) et l'interféron (IFN- γ). En effet l'activation des macrophages infectés est réalisée en particulier par des lymphokines produites par des lymphocytes T (Nancy C.A. *et al.*, 1981) (Murray W.H. *et al.*, 1982) (Mauel J. *et al.*, 1982). Des surnageants de lymphocytes T stimulés *in vitro* par un antigène ou un mitogène (concanavaline A) induisent une activation des macrophages infectés par *Leishmania* conduisant à la destruction de parasites à l'intérieur de macrophages (Buchmüller Y. *et al.*, 1979) (Nancy C.A. *et al.*, 1980).

L'IFN- γ est le facteur majeur d'activation des macrophages humains infectés *in vitro* par *L. donovani* (Murray W.H. *et al.*, 1983). Les mêmes auteurs ont confirmé cette constatation dans le modèle expérimental, la souris, chez laquelle l'IFN- γ s'est avéré être un activateur majeur de macrophages infectés *in vivo* et *in vitro* (Murray W.H. *et al.*, 1985).

Titus *et al.* ont démontré que le facteur d'activation de macrophage (MAF) et l'IFN- γ sont responsables de l'activation de macrophages infectés *in vitro* par *L. major* et par conséquent de la destruction des parasites intracellulaires (Titus R.G. *et al.*, 1984). Certains auteurs ont suggéré que l'activation des macrophages pourrait être induite par un mécanisme indépendant des lymphokines et par l'intermédiaire de lymphocytes T spécifiques d'antigène et restreints par le complexe majeur d'histocompatibilité (Wyler D.J. *et al.*, 1987). L'inhibition de la production de lymphokines par la cyclosporine A et le traitement de ces cellules T par un anticorps anti-IFN- γ n'affecte pas la capacité qu'ont les cellules T à activer les effets antimicrobiaux du macrophage.

Une récente étude a suggéré que les cellules T de phénotype CD8⁺ peuvent aussi être protectrices contre une infection par *L. major*. En effet, des souris résistantes (CBA) ne contrôlent plus l'infection après des traitements répétés par un anticorps monoclonal anti-CD8⁺. Cependant, l'effet de ce traitement est beaucoup moins efficace que le traitement avec un anticorps anti-CD4⁺ (Titus R.G. *et al.*, 1987).

5-2-3-2. Existence de cellules T "exacerbatrices".

La permissivité des souris BALB/c à l'infection par *L. major* n'est pas due à l'incapacité de ces souris à développer des lymphocytes T effecteurs CD4⁺ contre ces parasites. En fait, les souris BALB/c peuvent devenir résistantes à l'infection par *L. major* après différents traitements: injection dès la naissance d'un anticorps monoclonal anti- μ , injection d'anticorps monoclonal anti-CD4⁺ ou injection de cyclosporine A (Sacks D.L. *et al.*, 1984) (Titus R.G. *et al.*, 1985) (Behforouz N.C. *et al.*, 1986). Ces souris développent une hypersensibilité retardée (HSR) et une résistance transférables à des souris syngéniques;

les cellules T protectrices sont de phénotype CD4⁺, semblables à celles trouvées chez les souris résistantes guéries d'une infection et produisent du MAF et de l'IFN- γ lorsqu'elles sont mises en culture *in vitro* avec des antigènes de *Leishmania* (Liew F.Y. *et al.*, 1982). Cette résistance induite chez les souris BALB/c, par les traitements mentionnés ci-dessus, peut être éliminée par le transfert de lymphocytes T de souris BALB/c normales ou même infectées par *L. major* (Howard J.G. *et al.*, 1981). Donc, une sous-population de lymphocytes T provenant de souris BALB/c normales ou infectées est de cellules exacerbatrices (Te) tandis que chez les souris résistantes guéries d'une infection des cellules protectrices (Tp) de phénotype CD4⁺ sont mises en évidence. Ces cellules "exacerbatrices" expriment aussi le phénotype CD4⁺ mais ne transfèrent pas la HSR et peuvent empêcher le développement de la HSR induite par le transfert de cellules T protectrices (Tp) (Liew F.Y. *et al.*, 1982).

Titus *et al* ont démontré que le transfert de lignées T exprimant le marqueur L3T4⁺ (CD4⁺), (cellules "helper") spécifiques de *L. major*, à des souris susceptibles (BALB/c) ou résistantes (CBA), au cours d'une infection par *L. major* entraînent une exacerbation des lésions; ces cellules exacerbatrices (Te) sécrètent *in vitro* de l'IL-2 et de l'IFN- γ (Titus R.G. *et al.*, 1984). D'autres travaux ont montré qu'au cours de l'infection par *L. major*, la fréquence des cellules T spécifiques de *L. major* de phénotype L3T4⁺ chez les souris BALB/c (susceptibles) est de l'ordre de 80-90% tandis que chez les souris CBA (résistantes) ce taux de cellules est le même que celui des cellules de phénotype Lyt2⁺(CD8⁺) (Milon G. *et al.*, 1986).

5-2-3-3. Comparaison entre les cellules Th1, Th2 et Tp, Te.

Des études récentes ont démontré que les clones de cellules T "helper" de phénotype L3T4⁺ (CD4⁺) chez la souris peuvent être divisés en deux sous-populations en fonction du type de lymphokine qu'ils produisent. Ainsi, les cellules qui sécrètent l'IL-2 et l'IFN- γ sont désignées comme Th1 tandis que celles qui produisent l'IL-4 et l'IL-5 sont appelées Th2, l'IL-3 étant sécrétée par les deux types de cellules T (Mosmann T.R. *et al.*, 1986).

Il semble que les lymphokines jouent un rôle déterminant dans l'évolution de l'infection. Récemment, Mazingue *et al* ont montré que l'IL-2 peut influencer la croissance de promastigotes de *L. amazonensis in vitro* et entraîne *in vivo* une exacerbation de lésions chez les souris BALB/c infectées par le même parasite (Mazingue C. *et al.*, 1989).

Par ailleurs, il a été démontré que l'IL-3 et le GM-CSF induisent une exacerbation des lésions chez les souris BALB/c infectées par *L. major*. Il a été suggéré que ces lymphokines attirent les macrophages vers le site d'infection aboutissant ainsi au développement des parasites et à l'exacerbation des lésions (Louis J.A. *et al.*, 1987) (Kindler V. *et al.*, in press) (Solbach W. *et al.*, 1987).

Locksley *et al* ont montré que les lymphocytes T de souris C57BL/6, naturellement résistantes, guéries de l'infection par *L. major* produisent de l'IFN- γ *in vitro* et *in vivo*. La présence d'une quantité importante de mRNA de l'IFN- γ est détectée dans les cellules T de ces souris. Par contre, les lymphocytes T de souris BALB/c, susceptibles à l'infection, non-guéries produisent faiblement de l'IFN- γ *in vitro* ou *in vivo* alors que la quantité de mRNA d'IL-4 trouvée dans les lymphocytes T de ces souris est importante.

Cette différence de type de lymphokines secrétées par les cellules T permet de supposer que les souris BALB/c développent, lors de l'infection par *Leishmania*, une réponse cellulaire médiée essentiellement par des cellules T exacerbatrices (Te) de type Th2, tandis que chez les souris C57BL/6 la réponse cellulaire est médiée par des cellules T protectrices (Tp) de type Th1 (Locksley M.R. *et al.*, 1987).

5-2-4. Tentatives de vaccination expérimentale.

De nombreuses essais de vaccination expérimentale ont été réalisés. Une protection peut être obtenue chez des souris sensibles à l'infection par immunisation avec des promastigotes irradiés de *L. tropica* (Howard J.G. *et al.*, 1982). Dans d'autres études, l'injection de promastigotes morts de *L. donovani*, en présence d'adjuvant, induit un bon degré de protection chez la souris (Holbrook T.W. *et al.*, 1981).

D'autres travaux utilisant des clones non pathogènes de promastigotes de *L. major* ont abouti à une protection partielle contre une infection cutanée par *L. major* chez des souris BALB/c (Mitchell G.F. *et al.*, 1984).

L'importance de la voie d'immunisation dans l'induction d'une immunité protectrice contre la leishmaniose cutanée a été étudiée par plusieurs auteurs. Ainsi, une protection contre la leishmaniose cutanée est observée chez la souris seulement après immunisation avec des promastigotes irradiés de *L. major* par voie intraveineuse i.v ou intrapéritonéale i.p, les injections sous-cutanée s.c ou intramusculaire i.m étant complètement incapables d'induire une immunité protectrice. De plus, les injections s.c et i.m sont non seulement inefficaces dans l'induction d'une protection, mais elles rendent les souris plus susceptibles et bloquent la réponse protectrice obtenue par une immunisation i.v ultérieure avec des promastigotes irradiés de *L. major* (Liew F.Y. *et al.*, 1985a).

Le fait que le même antigène administré par différentes voies puisse induire des réponses immunitaires variables implique différents processus de présentation d'antigène par plusieurs types de cellules présentatrices d'antigène.

En effet, il semble que l'immunisation des souris par voie s.c avec des promastigotes irradiés de *L. major* induit une réponse cellulaire médiée par des cellules T de phénotype CD4⁺ incapables de conférer une immunité protectrice contre une infection par *L. major*. Ces cellules T (T_e), induites par les injections s.c ou i.m ne sécrètent pas d'IFN- γ lors de leur mise en culture *in vitro* avec des antigènes de *Leishmania*, mais produisent de l'IL-3 et de l'IL-4.

Par contre, l'immunisation par voie i.v ou i.p induit une réponse cellulaire médiée par des cellules T protectrices de phénotype CD4⁺ capables de conférer une immunité protectrice vis-à-vis d'une infection par *L. major* chez des souris BALB/c (Liew F.Y. *et al.*, 1985b). Ces cellules protectrices sécrètent l'IFN- γ et l'IL-2 en culture *in vitro* avec des antigènes de *Leishmania*.

Il est clair donc que des souris BALB/c peuvent être protégées contre une infection par *L. major* par immunisation i.v ou i.p avec des promastigotes irradiés ou morts mais ni les antigènes responsables de cette protection ni les mécanismes immunologiques impliqués dans la protection ne sont encore bien définis.

L'immunisation avec un extrait antigénique soluble de *L. major* protège les souris BALB/c contre une infection par le même parasite. Cette protection est associée avec l'induction d'une immunité cellulaire (Scott P. *et al.*, 1987). Dans un deuxième temps les mêmes auteurs ont testé différentes fractions antigéniques de l'extrait soluble de *L. major*; ils ont constaté que deux fractions sont capables de stimuler les lymphocytes T alors qu'une seule fraction est capable d'induire une protection contre une infection par *L. major* chez les souris BALB/c. Dans une étude plus récente, Scott *et al* ont établi des lignées de lymphocytes T spécifiques de fractions antigéniques protectrice et non protectrice afin de tester leurs activités immunologiques. Ils ont observé que la lignée cellulaire T, produite contre la fraction antigénique protectrice, transfère une protection équivalente à celle obtenue lors d'une immunisation active par la même fraction tandis que la lignée spécifique de la fraction antigénique non protectrice ne confère aucune protection à des souris BALB/c contre une infection par *L. major* et provoque au contraire une exacerbation des lésions. De plus, ces lignées de cellules T sont différentes selon le type de lymphokine qu'elles produisent, la lignée protectrice sécrète de l'IL-2 et de l'IFN- γ , la lignée exacerbatrice produit de l'IL-4 et de l'IL-5.

Ainsi, la lignée T protectrice (Tp) possède le critère de cellules Th1 alors que la lignée T exacerbatrice (Te) semble avoir le critère de cellules Th2 (Scott P. *et al.*, 1988).

En conclusion :

La plupart des observations cliniques et expérimentales montrent que la résistance immunitaire à une leishmaniose qu'elle soit cutanée, mucocutanée ou viscérale, est dépendante du type de sous-populations de cellules T mise en oeuvre.

Il apparaît que deux types de sous-populations T de phénotype CD4⁺ peuvent être induites par l'immunisation avec des promastigotes morts ou avec des antigènes purifiés par différentes voies d'injection :

a-) Les injections i.v et i.p induisent préférentiellement des cellules T protectrices (Tp=Th1) qui sécrètent de l'IFN- γ en culture avec des antigènes de *Leishmania*. L'IFN- γ active les macrophages infectés aboutissant à la destruction intracellulaire de parasites.

b-) Les injections s.c ou i.m stimulent des cellules T exacerbatrices (Te=Th2); ces cellules produisent, lors de la mise en culture avec des antigènes de *Leishmania*, de l'IL-4 et de l'IL-5 et non pas de l'IFN- γ .

Les mécanismes par lesquels les deux sous-populations de lymphocytes T de phénotype CD4⁺ sont préférentiellement induites demeurent inconnus.

6. Les antigènes de surface de *Leishmania*.

6-1. Analyse des antigènes de surface.

Des études préliminaires sur les composants de surface des promastigotes de *L. donovani* et *L. chagasi* ont démontré, par l'analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl-sulfate (SDS-PAGE), la présence de quatre protéines de poids moléculaire 65, 60, 50 et 26 kDa.

Par ailleurs, un travail portant sur le profil d'antigènes de surface de promastigotes de parasites du complexe *L. donovani*, isolés en Afrique et au Brésil, a montré qu'il n'y a pas de différence antigénique entre les espèces de ce complexe, et qu'une glycoprotéine de 65 kDa, reconnue par des sérums immuns de malades de régions géographiquement différentes, est le composant majeur de surface de ces espèces du complexe *L. donovani* (Lemesre J.L. et al., 1985). Dans une étude utilisant le sérum de sujets atteints de kala-azar, une glycoprotéine majeure de 64 kDa a été décrite à la surface de *L. donovani* (Lepay D.A. et al., 1983).

Plusieurs études réalisées sur la surface de promastigotes de différentes espèces de *Leishmania* ont démontré la présence d'une protéine membranaire abondante d'un poids moléculaire de 63-68kDa (Fong D. *et al.*, 1982) (Gardiner P.R. *et al.*, 1984) (Etges R.J. *et al.*, 1985).

Des réactions immunologiques croisées ont été observées vis-à-vis de cette protéine en utilisant des sérums de chiens naturellement infectés par *L. donovani* et des sérums de souris immunisées avec l'antigène gp63 de *L. major*.

De plus, l'analyse peptidique de cet antigène de différentes espèces démontre une grande homologie structurale suggérant ainsi que la structure primaire de ces protéines a été conservée entre les différentes espèces de *Leishmania* (Etges R.J. *et al.*, 1985).

6-2. L'antigène majeur de surface de *Leishmania* Gp65.

6-2-1. Analyse biochimique de Gp65.

La glycoprotéine majeure membranaire de *L. major* de 63kDa est présente à raison de 500,000 copies/cellule à la surface des promastigotes; elle représente approximativement 1% des protéines cellulaires totales chez les promastigotes de *L. major* (Etges R.J. *et al.* , 1985). Cette glycoprotéine est distribuée sur la surface entière du promastigote y compris le flagelle (Fong D. *et al.*, 1982).

Une des caractéristiques importantes de la gp63 est la facilité de se marquer par radio-iodination; dans le cas de *L. major*, 70% de l'iode incorporé sont associés avec la gp63 (Etges R. *et al.*, 1985).

L'affinité de cet antigène pour les lectines WGA et de *Helix pomatia*, permet de penser que des liaisons N-acétylglucosamine et N-acétyl- galactosamine sont exposées sur la gp63 (Russell D.G. *et al.*, 1986).

La déglycosylation de la gp63 par l'acide trifluoromethane sulfonique réduit le poids moléculaire apparent de cet antigène de 10-15% (Bouvier J. *et al.*, 1985). En effet, la

plupart de liaisons des glycanes de gp65 aux parties peptidiques sont de type N-glycosylation. En présence de tunicamycine, un inhibiteur de ce type de liaisons, les promastigotes synthétisent une protéine de 54-58 kDa. Cette molécule partiellement glycosylée est détectable à la surface des promastigotes par radio-iodination (Chang C-S. *et al.*, 1986).

Plusieurs méthodes de purification de la gp63 ont été utilisées avec succès. Après solubilisation des parasites par un détergent non-ionique, l'extrait antigénique total peut être enrichi en gp63 par passage sur une colonne de concanavaline A (Russell D.G. *et al.*, 1986) ou Triton x-114 (Etges R. *et al.*, 1985). Un point isoélectrique (pHi) de 6,7 pour la gp63 de *L. mexicana* a été décrit tandis qu'un pHi plus acide 5,8 a été démontré pour la gp63 de *L. major* (Russell D.G. *et al.*, 1986).

La gp63 est un constituant amphiphile de membrane ancré dans cette dernière par un glycophospholipide similaire à celui qui est associé avec la glycoprotéine variable de surface (VSG) de *T. brucei* (Etges R. *et al.*, 1986).

Le traitement de la gp63 par la phospholipase C, responsable de la libération de la VSG de *T. brucei*, hydrolyse l'ancrage membranaire hydrophobe de la gp63 et transforme la forme amphiphile de cet antigène en forme hydrophile; l'activité protéasique de la gp63 sous la forme hydrophile ou amphiphile est fonctionnelle à pH neutre et alcalin, la partie hydrophobe de la gp63 est un phospholipide (Etges R. *et al.*, 1986).

Une activité protéasique de cet antigène a été démontrée chez plusieurs espèces de *Leishmania*. Ainsi, Fong et Chang ont décrit brièvement deux enzymes majeurs de poids moléculaires situés entre 43 et 68 kDa chez *L. amazonensis* capables d'hydrolyser la gélatine et le fibrinogène après SDS-PAGE (Fong D. *et al.*, 1981).

Pupkis et Coombs ont mis en évidence sous une forme soluble une molécule de 67 kDa ayant une activité protéasique et commune aux deux stades de développement promastigote et amastigote de *L. mexicana* et *L. amazonensis* (Coombs G.H., 1982) (Pupkis M.F. *et al.*, 1982).

Récemment, Etges *et al.* ont démontré une activité protéasique de la gp63 chez différentes espèces de *Leishmania*. Cette activité est retrouvée dans les extraits antigéniques

de parasites, et chez les promastigotes vivants ou fixés (Etges R. *et al.*, 1986).

Récemment, le gène codant la gp63 de promastigote de *L. major* a été cloné; les études d'hybridation ont démontré qu'il y a plusieurs copies de ce gène dans le génome de *L. major* et d'autres espèces de *Leishmania* (Button L.L. *et al.*, 1988).

La conservation d'une part de la séquence codant pour la gp63 dans différentes espèces de *Leishmania*, et d'autre part de l'activité protéasique de cet antigène gp63 souligne l'importance de cette molécule durant le cycle évolutif de ce parasite (Etges R. *et al.*, 1986).

6-2-2. Rôle de l'antigène majeur de surface GP65 dans l'infectivité.

L'implication des antigènes de surface de promastigotes dans l'infectivité des parasites a été largement étudiée. Ainsi, Russell *et al.* ont démontré que l'antigène gp63 de *L. mexicana* joue un rôle important dans l'attachement des promastigotes à la surface des macrophages; l'implication de la gp63 de *L. mexicana* dans l'adhésion a été mise en évidence d'une part par l'inhibition de l'attachement des promastigotes aux macrophages par des fragments F(ab) des antisérums polyclonaux spécifiques de gp63; d'autre part par des études réalisées sur l'interaction de protéoliposomes contenant la molécule gp63 avec des macrophages de la lignée J774 ces protéoliposomes adhèrent aux macrophages, puis sont internalisés; l'interaction a été inhibée par des fragments Fab anti-GP63, ce qui montre l'implication de cet antigène dans l'adhésion de *Leishmania* aux macrophages (Russell D.G. *et al.*, 1986).

D'autres travaux ont identifié un récepteur (CR3) à la surface de macrophage pour le troisième composant du complément comme étant un participant potentiel dans l'internalisation de promastigotes de *Leishmania* par des macrophages de souris (Blackwell J.M. *et al.*, 1985). Récemment, il a été démontré qu'une grande homologie de structure existe entre le troisième composant du complément et la gp63 de *L. mexicana* ce qui peut expliquer l'implication de cet antigène dans l'infection (Russell D.G., 1987).

Par ailleurs, des études sur les interactions parasite macrophage ont démontré que l'attachement du parasite se fait par une liaison d'affinité des glycanes de gp65 à leur

récepteur mannose-fucose présents à la surface du macrophage (Blackwell J.M., 1985).

De plus, l'activité phagocytaire des macrophages envers les liposomes augmente fortement par l'incorporation de gp63 purifié dans ces liposomes. L'inhibition de ces interactions par le mannane suggère que le mannose présent dans la gp63 est responsable de cette interaction des protéoliposomes avec le récepteur mannose-fucose des macrophages (Russell D.G. *et al.*, 1986).

6-2-3. Rôle de l'antigène majeur de surface GP65 dans la protection.

Certaines études ont été réalisées sur des antigènes purifiés de surface du promastigote de *Leishmania* afin de tester leur rôle dans la protection. Ainsi, Monjeur *et al.* ont démontré que des fractions antigéniques de poids moléculaire 64-97 kDa purifiées de promastigotes de *L. donovani* ou *L. major* sont capables d'induire une protection contre une infection par *L. major* ou *L. mexicana* (Formmel D. *et al.*, 1988). D'autres travaux ont montré que les souris CBA, naturellement résistantes, ne développent pas de lésions dans une infection par 10^4 et 10^6 promastigote de *L. amazonensis* lorsqu'elles sont immunisées par une glycoprotéine de 46kDa de promastigotes du même parasite. Alors que chez les souris BALB/c, sensibles à l'infection, la protection n'est pas totale (28% à 50%) (Champsi J. *et al.*, 1988).

Récemment, l'antigène majeur de surface de promastigote de *L. mexicana* GP63 a été introduit dans des liposomes et utilisé pour immuniser des souris BALB/c et CBA/ca contre une infection expérimentale par *L. mexicana*. L'inoculation de cet antigène, même à faibles doses (8 à 10µg/souris), induit un niveau appréciable de protection. Le transfert passif a montré que cette protection est due à l'établissement d'une immunité à médiation cellulaire (Russell D.G. *et al.*, 1988).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats nous a permis d'envisager une étude de l'antigène majeur de surface de *Leishmania*, la gp65, afin de mieux comprendre son rôle dans

l'infection et ensuite d'étudier le rôle de l'immunité cellulaire vis-à-vis de la gp65 dans la Leishmaniose expérimentale.

TRAVAUX PERSONNELS

Article 1Définition des conditions de culture nécessaires à la standardisation de la croissance des promastigotes de *Leishmania in vitro*.

Comme nous l'avons développé dans l'introduction, ce travail de standardisation de culture a été nécessaire avant d'aborder notre étude proprement dite de la gp65. Dans ce premier article nous avons effectué un travail de standardisation des cultures de promastigotes de deux espèces de *Leishmania* : *L. chagasi* (souche Impéatriz) et *L. braziliensis* (souche LV65), parasites responsables respectivement des Leishmanioses viscérale et cutanéomuqueuse.

Ensuite, nous avons déterminé si les critères de croissance de *L. chagasi* et *L. braziliensis* sont applicables à d'autres espèces du genre *Leishmania*.

Nous avons démontré que :

- 1-) La concentration de l'inoculum parasitaire (10^4 à 10^6 parasite/ml) influence clairement la courbe de croissance et cela pour toutes les espèces étudiées du genre *Leishmania*, quelque soit le milieu monophasique de culture utilisé. En effet, en faisant varier la concentration de l'inoculum de départ, l'aspect général de la courbe de culture change. Pour les différentes espèces de *Leishmania* étudiées, les phases de latence et de multiplication exponentielle sont écourtées lorsque cette concentration augmente.
- 2-) En utilisant la même concentration parasitaire au départ, dans toutes les espèces testées, la variation du volume de milieu de culture n'avait pas d'incidence sur la cinétique de la culture. Seul le nombre total de promastigotes obtenu en phase stationnaire augmentait avec le volume d'incubation.
- 3-) Nous avons observé que, quelque soit le milieu de culture utilisé, le comportement de *L. infantum* et *L. chagasi* se ressemblent, tandis que celui de *L. braziliensis* est similaire au comportement des autres espèces responsables de Leishmaniose cutanée, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*.

En conclusion, pour la suite de nos travaux, nous avons choisi comme concentration de départ 1×10^5 parasites/ml pour *L. chagasi* et 5×10^5 parasites/ml pour *L. braziliensis* et les autres espèces étudiées, ces concentrations conduisant à des courbes de croissance très reproductibles, avec les différentes phases de latence, exponentielle et stationnaire bien individualisées.

L'article N° 2 est présenté page N° 61.

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM U 167 – CNRS 624,
Institut Pasteur de Lille, France

Requirements of defined cultivation conditions for standard growth of *Leishmania* promastigotes in vitro

J. L. LEMESRE*, F. DARCY, M. KWEIDER, A. CAPRON, F. SANTORO

Summary

The growth characteristics of *L. chagasi* (MHOM/BR/79/LI01) and *L. braziliensis* (MHOM/BR/72/1670), the causative agents of visceral and muco-cutaneous leishmaniases, respectively, were compared. Inoculum size clearly influences the growth course of both *Leishmania* species, whatever the culture medium used (serum-supplemented media: GLSH or RPMI, and a chemically defined medium: LITR9). Cultures initiated with low concentrations failed to promote cell growth, while typical growth curves were obtained when higher promastigote inocula were used. For all the species tested, the higher the initial density of flagellates in the medium, the shorter were the periods covered by the latent and particularly by the logarithmic growth phases. In contrast, using constant inocula, variations in the volume of the incubation medium did not change the time-course of the different culture phases of either *Leishmania* species, provided that the ratio of incubation medium to total flask volume was comparable. Only cell division time significantly increased with the culture volume. We also determined whether or not the growth characteristics of the promastigotes of *L. chagasi* or *L. braziliensis* could be generalized to other members of the genus. Our results show that, whatever the culture medium used, *L. infantum* behaves in the same way as does *L. chagasi*, whereas *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana* and *L. amazonensis* display growth patterns similar to that of *L. braziliensis*.

Key words: *Leishmania* promastigotes; growth characteristics; reproducible growth curves; defined cultivation conditions.

* Present address: Office de la Recherche Scientifique et Technique d'Outre-mer (ORSTOM),
Centre de Brazzaville, B.P. 181, Brazzaville, République Populaire du Congo

Introduction

Leishmania species have a simple life cycle which includes a flagellate promastigote form in the sandfly vector and a non-flagellate intracellular amastigote stage within the mononuclear phagocytes of vertebrate hosts.

In cell-free medium at 26°C, the parasites grow and multiply as a promastigote form similar to that found in the vector (Bray, 1974) which remains infective when injected into susceptible hosts (Keithly, 1976). In vitro cultivation of *Leishmania* species opened up new possibilities for the determination of the biochemical and immunological characteristics of these parasites (Schnur et al., 1972; Chance et al., 1974; Kreutzer and Christensen, 1980; McMahan-Pratt et al., 1982). In particular a large range of studies focused on the comparison of surface antigens of various *Leishmania* species and sub-species (Handman and Hocking, 1982; Lepay et al., 1983; Gardiner et al., 1984; Lemesre et al., 1985).

Recent work has shown a sequential development of promastigotes from a noninfective to an infective stage in the case of *L. tropica* and *L. chagasi*, both in vitro (Sacks and Perkins, 1984; Rizvi et al., 1985) and in the sandfly vector (Sacks and Perkins, 1985). In addition, modifications in the expression of some surface components of promastigotes during the course of culture appear to be associated with their infectivity (Sacks et al., 1985; Rizvi et al., 1985; Kweider et al., 1987). These clearly defined changes in the parasite during in vitro differentiation highlights the utmost importance of defined culture conditions in order to obtain reproducible growth curves with well controlled maturation stages.

To further compare the biological behaviour of *L. braziliensis* and *L. chagasi*, parasites responsible for two different pathological manifestations of leishmaniasis (muco-cutaneous and visceral), it was necessary to first standardize the culture conditions of both *Leishmania* species. As a second step, we attempted to determine whether or not the growth characteristics of the promastigotes of *L. chagasi* or *L. braziliensis* could be generalized to other members of the genus *Leishmania*.

Materials and Methods

Parasites. – The following strains of visceral, cutaneous and mucocutaneous *Leishmania* species used throughout this study were generously provided by Dr D. Le Ray (ITMA, Anvers, Belgium) and Dr M. Sadigursky (FIOCRUZ, Salvador de Bahia, Brazil): *L. chagasi* (MHOM/BR/79/LI01), *L. infantum* (MHOM/BL/67/IT263), *L. braziliensis* (MHOM/BR/72/1670), *L. panamensis* (MCHO/PA/00/M4039), *L. guyanensis* (MHOM/BR/78/M5378), *L. mexicana* (MNYC/BZ/62/M379) and *L. amazonensis* (MHOM/VE/76/JAP78). They were maintained in our laboratory by subculture in liquid monophasic media.

Culture media. – GLSH (Glucose, Lactalbumin, Serum and Haemoglobin) developed by Jadin and Le Ray (1969) and RPMI 1640, supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated bovine serum were used. Crystalline penicillin and streptomycin were added to a final concentration of 50 to 100 µg per milliliter to decrease the risk of bacterial contamination.

A chemically defined culture medium, recently described and called LITR9 (Sadigursky and Brodskyn, 1986) was also used. To basic LIT medium containing liver infusion broth and tryptose, a mixture of RPMI 1640 and Medium 199 was added. This combination permitted high parasite yields.

Cultivation procedure. – The standard incubation temperature was $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Cultures of promastigotes of all *Leishmania* species were routinely maintained by bi-weekly passage of mid-log phase parasites into 50 ml of fresh GLSH, RPMI or LITR9 culture media. Initial concentrations of promastigotes were 10^5 flagellates per ml for *L. chagasi* and *L. infantum* and 5.0×10^5 flagellates per ml for the other *Leishmania* species. For the standardization of *L. chagasi* and *L. braziliensis* cultures, variable concentrations of mid-log phase promastigotes (see results) were transferred to 250 ml flasks containing 50 ml of culture medium. Cultivation of mid-log phase promastigotes at a precise density was also performed in 250, 50 or 25 ml calibrated flasks (Gravis, France) containing 50, 10 or 5 ml of culture medium, respectively. Two replicate experiments using three replicate culture flasks per test were carried out for 10^5 and 5.0×10^5 initial concentration in GLSH, RPMI and LITR9 media.

Promastigote counts. – $20 \mu\text{l}$ of Vortex-homogenized culture samples were mixed with $20 \mu\text{l}$ of Hanks balanced salt solution (HBSS) containing 0.2% glutaraldehyde (SERVA, Heidelberg, W. Germany). The flagellate concentrations were determined after adequate dilution in HBSS by enumeration of fixed promastigotes in a Thoma-counting chamber at $400\times$ magnification. Simultaneously, Erythrosin B staining was used to differentiate between alive and dead cells. $50 \mu\text{l}$ promastigote suspension and $50 \mu\text{l}$ 0.4% Erythrosin B staining solution were previously precooled to 4°C and then mixed. After 5 min incubation in ice, one drop was examined at $400\times$ magnification in order to determine the percentage viability (stained promastigotes were nonviable).

Results

The following results were obtained by counting daily the promastigote number of various *Leishmania* species in different culture conditions. Since standard deviations for each test point were below 5% of the corresponding mean values, the data could be compared for significant differences. In parallel, Erythrosin B staining demonstrated that for all species studied the percentage mortality was less than 5% during the exponential growth phase and reached 15 to 20% in the late stationary phase (data not shown).

Fig. 1, which represents the growth curves of *L. chagasi* (A) and *L. braziliensis* (B) promastigotes in GLSH medium, clearly demonstrates the obvious influence of the inoculum on the multiplication of both parasites and in addition significant differences in the growth rates of the two *Leishmania* species. Culture initiated with low concentrations (10^4 *L. chagasi* and 2.0×10^5 *L. braziliensis* parasites per ml) failed to grow, while typical growth curves were obtained when higher promastigote concentrations were used. Cultures initiated with densities ranging from 10^5 to 10^6 organisms per ml for *L. chagasi* (Fig. 1 A) and from 5.0×10^5 to 10^6 parasites per ml for *L. braziliensis* (Fig. 1 B) supported intensive growth. Moreover, the time when the latent phase ended and the point at which the logarithmic growth phase merged into the stationary phase, were also dependent on the original density. The latent phase completely disappeared when inocula of 5.0×10^6 promastigotes and more were used (data not shown). Greater numbers of flagellates in the inocula resulted in shorter latent and logarithmic phases and in a higher number of generations. Indeed, the

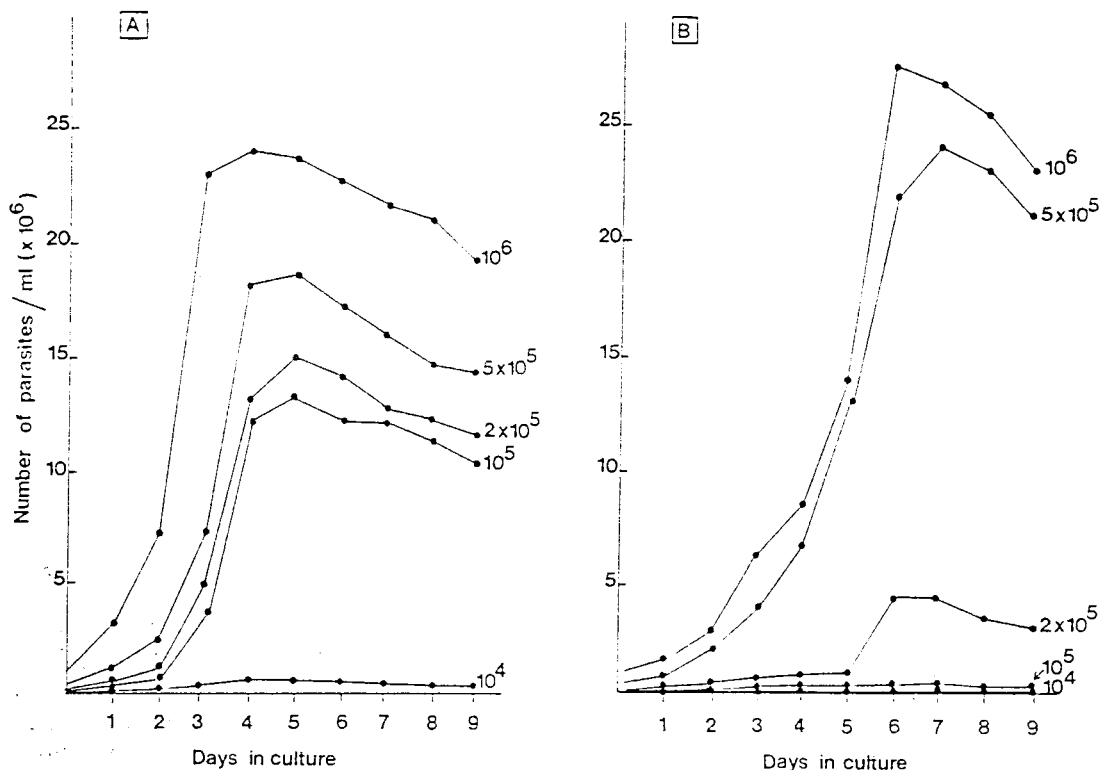


Fig. 1. Influence of the initial inoculum of promastigotes on the growth curves of *L. chagasi* (A) and *L. braziliensis* (B) in GLSH-medium. Original concentrations (number of flagellates/ml) are indicated. The volume of incubation medium was constant throughout this study (50 ml).

number of promastigotes (x) at peak growth was greater in cultures started with higher densities of organisms (y). Nevertheless the ratio x/y gradually decreased as y increased (Fig. 1).

Significant differences in the growth rate were also observed between *L. chagasi* and *L. braziliensis* cultures. Fig. 1 shows that with the initial population densities of 5.0×10^5 or 10^6 parasites per ml *L. chagasi* cultures always entered more quickly into the stationary phase than did *L. braziliensis* cultures; nevertheless, the number of parasites at the stationary phase was always lower with *L. chagasi*.

RPMI medium was also used to cultivate these two *Leishmania* species. Of interest is the fact that this medium did not support sustained growth of *L. braziliensis* (data not shown). By contrast, RPMI was able to promote a significant multiplication of *L. chagasi* promastigotes when adequate parasite concentrations were used (Fig. 2). Similar effects of the concentration of the inoculum on the growth of *L. chagasi* were found in RPMI medium when compared to GLSH medium. However, total cell yields were slightly higher in RPMI medium whatever the original population densities used.

The growth curves represented in Fig. 3 show the influence of the original volume of GLSH medium on *L. braziliensis* (A) and *L. chagasi* (B) cultures

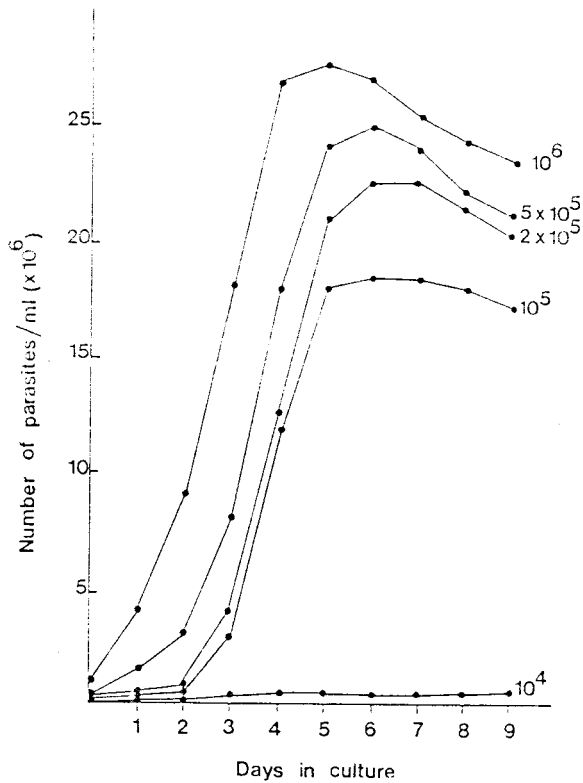


Fig. 2. Effect of the initial inoculum of promastigotes on the growth course of *L. chagasi* in RPMI medium. Original concentrations (number of flagellates/ml) are indicated. The volume of incubation medium was 50 ml.

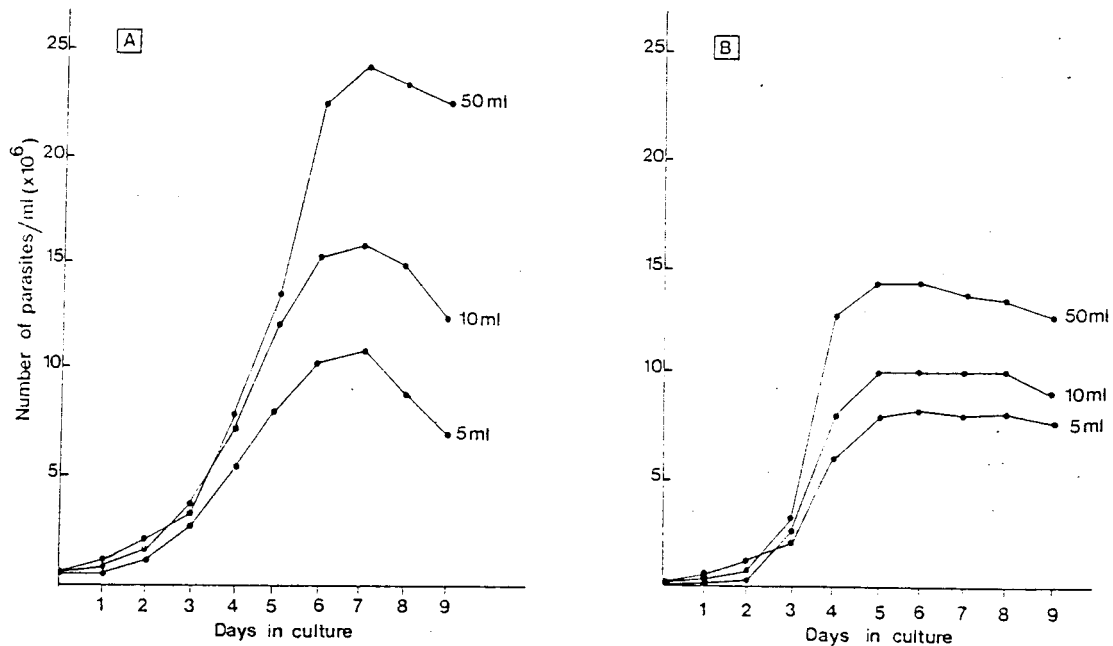


Fig. 3. Influence of the initial volume of incubation medium (GLSH) on the growth rate of *L. braziliensis* (A) and *L. chagasi* (B) culture initiated with constant densities of mid-log phase promastigotes (5.0×10^5 and 10^5 parasites per ml, respectively).

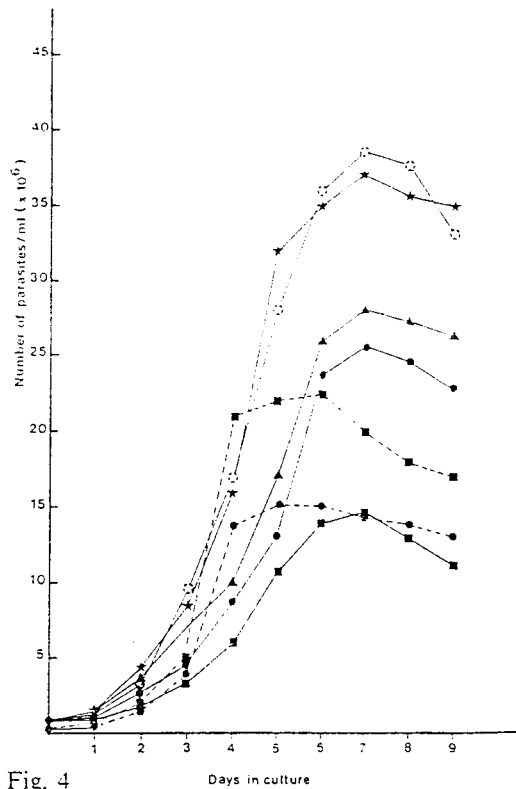


Fig. 4

Days in culture

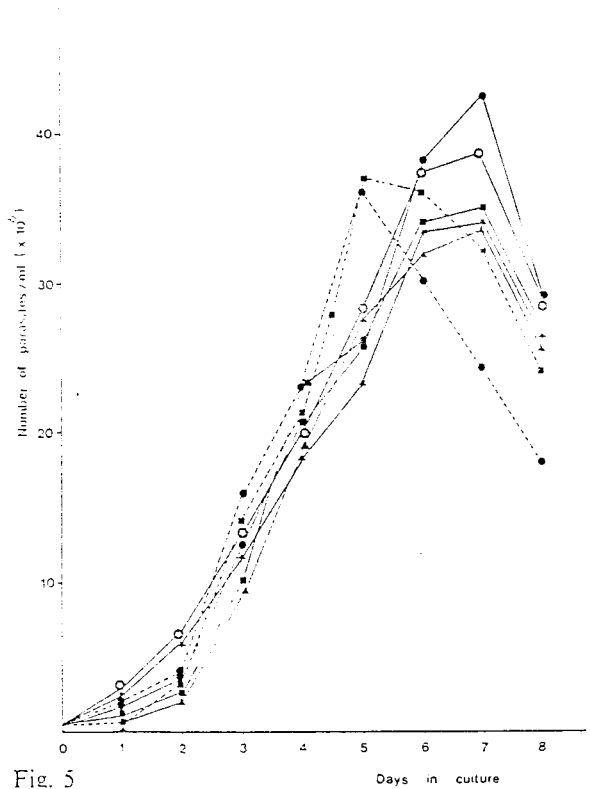


Fig. 5

Days in culture

Fig. 4. Growth patterns of *L. chagasi* (●---●), *L. infantum* (■---■), *L. braziliensis* (●—●), *L. panamensis* (▲—▲), *L. guyanensis* (■—■), *L. mexicana* (★—★), and *L. amazonensis* (⊗—⊗) culture in GLSH medium (50 ml) initiated with 10^5 promastigotes per ml for *L. chagasi* and *L. infantum* and 5.0×10^5 flagellates per ml for the other *Leishmania* species.

Fig. 5. Growth patterns of *L. chagasi* (●---●), *L. infantum* (■---■), *L. braziliensis* (●—●), *L. panamensis* (▲—▲), *L. guyanensis* (■—■), *L. mexicana* (★—★), and *L. amazonensis* (⊗—⊗) culture in LITR9 medium (50 ml) initiated with 10^5 promastigotes per ml for *L. chagasi* and *L. infantum* and 5.0×10^5 flagellates per ml for the other *Leishmania* species.

initiated with constant densities of mid-log phase promastigotes (5.0×10^5 and 10^5 parasites per ml, respectively). The ratio of culture volume to total flask volume was constant throughout this study (1/5). The general configuration of the culture curves of *Leishmania* species did not change when the volume of incubation medium varied from 5 to 50 ml. Indeed, periods covered by the latent and logarithmic growth phases were similar for each parasite. By contrast, total cell yield significantly increased when the volume of the incubation medium was larger, demonstrating an increase in the speed of promastigote multiplication.

The reported statements concerning the influence of inoculum concentration and incubation volume on *L. chagasi* and *L. braziliensis* growth, established in both GLSH and RPMI media were also demonstrated for the two species in a completely defined medium, LITR9 (data not shown).

The culture curves represented in Fig. 4 and Fig. 5 show the growth characteristics of other visceral and cutaneous *Leishmania* species in GLSH and LITR9 media, respectively. Initial inocula of 10^5 parasites per ml for *L. chagasi* and *L. infantum*, and 5.0×10^5 flagellates per ml for *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana* and *L. amazonensis* were chosen, since they lead to well-separated growth phases. Two growth patterns issue from these data. The first one is observed with both causative agents of visceral leishmaniasis, where the promastigotes switch from the logarithmic to the stationary phase of growth at about 5 days after the seeding. The second one is obtained with other species. Although the cultures were started with higher original density, the periods covered by the logarithmic growth phase was always longer and parasites entered the stationary phase only at the 7th day. In contrast to data observed with GLSH medium (Fig. 4), the stationary phase was very short when parasites were cultured in LITR9 (Fig. 5).

Discussion

A basic question emerges from recent studies on the importance of the maturation stage of *L. tropica* (Sacks and Perkins, 1984; Sacks et al., 1985), *L. chagasi* (Rizvi et al., 1985), *L. mexicana* (Mallinson and Coombs, 1986), and *L. braziliensis* (Kweider et al., 1987) culture promastigotes on infectivity, surface antigenic expression and enzyme content. Are the characteristics described for the above four species applicable to all other members of the genus? In order to answer this question, as a first step, it is important to determine whether or not different culture conditions exert a noticeable influence on the duration of the different growth phases of *Leishmania* cultures.

In the present work, we compared the growth characteristics of two different *Leishmania* species, *L. chagasi* and *L. braziliensis*, the causative agents of visceral and muco-cutaneous leishmaniases, respectively. This study was performed using various culture media: a new completely defined LITR9 medium (Sadigursky and Brodskyn, 1986) and two serum-supplemented monophasic media, RPMI 1640 and GLSH which is widely used in the cultivation of Old and New World cutaneous and visceral leishmanial organisms (Le Ray, 1974). While *L. chagasi* was capable of sustained in vitro growth in all these media, *L. braziliensis* failed to multiply in RPMI medium. It is worth mentioning that the latter species is difficult to grow in vitro (Le Ray et al., 1973), which explains why very little biochemical and immunological data have been obtained for this parasite.

Our study shows that the original parasite concentration influences the growth curve of both *Leishmania* species whatever medium was used (GLSH, RPMI or LITR9). First, parasites failed to multiply when their initial densities were too low which seems to indicate that growth is dependent on a minimal concentration of some metabolites, either excreted-secreted or processed from

the culture medium by the parasites. Indeed a recent study has demonstrated that media conditioned by *Leishmania* promastigotes could play a key role in their in vitro growth regulation (Lemesre et al., in preparation). In each species, when original flagellate concentrations of 10^6 parasites per ml or more were used, the latent and particularly the logarithmic growth phases were shorter. Moreover, *L. chagasi* multiplication occurred faster than that of *L. braziliensis*. Indeed, with comparable initial densities, there is a difference of about two days between the time at which *L. chagasi* and *L. braziliensis* entered the stationary phase. In contrast, using initial concentrations of 10^5 and 5.0×10^5 parasites per ml for *L. chagasi* and *L. braziliensis*, respectively, variations in the incubation medium volume did not change the time-course of the different culture phases of either *Leishmania* species. Only the rate of multiplication significantly increased with the culture volume. These data are of consequence when mass cultures are required. Indeed, we have found that using the original densities defined above, identical culture courses are obtained when these parasites are grown in 200 ml of GLSH medium (data not shown), provided that the ratio of incubation medium volume to total flask volume is comparable (1/5). This method has enabled us to produce large stocks of well-defined promastigotes from each maturation stage that are required for further studies of the parasites differentiation.

In view of the important differences observed between the culture patterns of *L. chagasi* and *L. braziliensis*, as a second step, we have compared the growth characteristics of other members of the *Leishmania* genus. Interestingly, in our culture conditions, the different species studied fall into only two categories, no intermediate patterns being observed. Indeed, *L. infantum* behaves in the same way as does *L. chagasi*, whereas species causing cutaneous disease display growth patterns similar to that of *L. braziliensis*. It is not yet possible to definitely establish a correlation between the growth characteristics of the *Leishmania* species and their clinical expressions, because the strains studied were adapted to long-term culture and thus do not reflect the characteristics of recently isolated parasites. Whilst Dvorak (1984) has demonstrated a variation in initial growth rate for different *Trypanosoma cruzi* cloned strains, the results presented here clearly show that growth characteristics differentiate *Leishmania* species. In this case, a possible strain effect can be presumed unlikely although this point remains to be tested. This study clearly demonstrates that, for instance, after 5 days, *L. infantum* and *L. chagasi* entered the stationary phase whereas the other species remained in the logarithmic phase. These data suggest that standard conditions for reproducible culture curves should be established in order to discriminate parasites from latent, logarithmic and stationary phases prior to physiological, biochemical and immunological studies depending on the maturation stages of *Leishmania* promastigotes.

All comparative studies on the biological properties of various *Leishmania* species reported before the work of Sacks and Perkins (1984) and Sacks et al.

(1985) were done either with non-defined stages (Schnur et al., 1972; Chance et al., 1974; Ramasamy et al., 1981; Handman et al., 1981; Handman and Hocking, 1982; Lepay et al., 1983) or poorly controlled log-phase promastigotes (Gardiner et al., 1984; Etges et al., 1985; Lemesre et al., 1985). Indeed, investigators have usually considered cultured promastigotes to be biologically uniform populations. The immediate question resulting from the finding of Sacks et al. (1985) is whether the differences previously reported between *Leishmania* species were due to biological changes accompanying promastigote differentiation or relate to genuine species characteristics. In the future, taxonomic classifications of *Leishmania* species based on isoenzyme or comparative surface antigenic studies should take the potential biological heterogeneity of cultured promastigotes into account and should be performed with parasites from standardized cultures with well-defined growth phases.

Acknowledgments

This work received financial support from the CEE [grant TSD-M-010-F(RS)], the Rockefeller Foundation, and UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. – We are grateful to Drs R. J. Pierce and D. Afchain for invaluable help in correction of this manuscript. – We also are thankful for the expert technical assistance of Marc Loyens and the secretarial help of Claudine Colson and Marie-France Massard.

- Bray R. S.: *Leishmania*. Ann. Rev. Microbiol. 28, 189–217 (1974).
- Chance M. L., Peters W., Shchory L.: Biochemical taxonomy of *Leishmania*. I. Observations on DNA. Ann. trop. Med. Parasit. 68, 307–316 (1974).
- Dvorak J. A.: The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. J. cell. Biochem. 24, 357–371 (1984).
- Etges R. J., Bouvier J., Hoffman R., Bordier C.: Evidence that the major surface proteins of three *Leishmania* species are structurally related. Molec. biochem. Parasit. 14, 141–149 (1985).
- Gardiner P. R., Jaffe C. L., Dwyer D. M.: Identification of cross-reactive promastigote cell surface antigens of some leishmanial stocks by ¹²⁵I labeling and immunoprecipitation. Infect. Immun. 43, 637–643 (1984).
- Handman E., Hocking R. E.: Stage specific, strain-specific and cross-reactive antigens of *Leishmania* identified by monoclonal antibodies. Infect. Immun. 37, 23–33 (1982).
- Handman E., Mitchell G. F., Goding J. W.: Identification and characterization of protein antigens of *Leishmania tropica* isolates. J. Immunol. 126, 508–512 (1981).
- Jadin J. B., Le Ray D.: Acquisitions récentes dans les techniques de culture des trypanosomes africains. Ann. Soc. belge Méd. trop. 49, 331–340 (1969).
- Keithly J. S.: Infectivity of *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes for golden hamsters. J. Protozool. 23, 244–245 (1976).
- Kreutzer R. D., Christensen H. A.: Characterization of *Leishmania* species by isoenzyme electrophoresis. Amer. J. trop. Med. Hyg. 29, 199–208 (1980).
- Kweider M., Lemesre J. L., Darcy F., Kusnierz J. P., Capron A., Santoro F.: Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65,000 dalton surface antigen. J. Immunol. 138, 299–305 (1987).
- Lemesre J. L., Rizvi F. S., Afchain D., Sadigursky M., Capron A.: Sub-species specific surface antigens of promastigotes of the *Leishmania donovani* complex. Infect. Immun. 50, 136–141 (1985).

- Lepay D. A., Nogueira N., Cohn Z.: Surface antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. *J. exp. Med.* 157, 1562-1572 (1983).
- Le Ray D.: Structures antigéniques de *Trypanosoma brucei brucei* (Protozoa, Kinetoplastida): analyse immunoélectrophorétique et étude comparative. Doctorat es-Sciences. Louvain 1974.
- Le Ray D., Afchain D., Jadin J., Capron A., Yasarol S., Lanotte G., Fameree L.: Diagnostic immunoélectrophorétique de la leishmaniose viscérale à l'aide d'un extrait antigénique hydrosoluble de *Leishmania donovani*. Résultats préliminaires. *Ann. Soc. belge Méd. trop.* 53, 31-41 (1973).
- Mallinson D. J., Coombs G. H.: Studies on the "Metacyclics" of *Leishmania*. British Society for Parasitology, Spring Meeting, 8-10 April 1986 (Abstract N° 15) (1986).
- McMahon-Pratt D., Bennet E., David J. R.: Monoclonal antibodies that distinguish subspecies of *Leishmania braziliensis*. *J. Immunol.* 129, 926-927 (1982).
- Ramasamy R., Jamnadas H., Mutinga M. J.: Proteins and surface proteins of *Leishmania* promastigotes and their possible relevance to the characterization of strains. *Int. J. Parasit.* 11, 387-390 (1981).
- Rizvi F. S., Afchain D., Sherlock I., Sadigursky M., Capron A., Santoro F.: Infectivity of *Leishmania* promastigotes is associated with surface antigenic expression. *Immunol. Lett.* 11, 317 (1985).
- Sacks D. L., Perkins P. V.: Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science (Wash. D.C.)* 223, 1417-1419 (1984).
- Sacks D. L., Perkins P. V.: Development of infective stage of *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sandflies. *Amer. J. trop. Med. Hyg.* 34, 456-459 (1985).
- Sacks D. L., Hiény S., Sher A.: Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J. Immunol.* 135, 564-569 (1985).
- Sadigursky M., Brodskyn C. I.: A new liquid medium without blood and serum for culture of hemoflagellates. *Amer. J. trop. Med. Hyg.* 35, 942-944 (1986).
- Schnur L. F., Zuckerman Z., Greenblatt C. L.: Leishmanial serotypes as distinguished by the gel diffusion of factors excreted in vitro and in vivo. *Israel J. med. Sci.* 8, 932-944 (1972).

Article 2

Relation entre l'infectivité des promastigotes de *L. braziliensis*
et l'augmentation de l'expression de l'antigène majeur de surface, la 65kDa.

Après avoir réalisé une étude de standardisation de conditions de culture de *Leishmania* nous avons abordé ce travail qui a consisté à mettre en évidence une modification de l'infectivité des promastigotes de *L.b.braziliensis*, vis-à-vis des macrophages péritonéaux de souris, au cours de leur maturation en culture, puis d'établir s'il existe une corrélation entre l'apparition des formes infectantes et d'éventuelles modifications de l'expression antigénique de surface des parasites.

C'est ainsi que nous avons pu démontrer :

- 1-) le développement séquentiel des promastigotes de *L.b.braziliensis* d'un stade non-infectant vers un stade infectant. La génération des formes infectantes est en rapport avec l'âge des parasites en culture et restreinte aux promastigotes de phase stationnaire.
- 2-) en utilisant un anticorps monoclonal (VD5/25) produit contre les antigènes de surface des promastigotes de *L. braziliensis*, l'immunofluorescence indirecte, faisant réagir cet anticorps monoclonal avec des promastigotes de *L. braziliensis*, a permis de mettre en évidence qu'une réaction plus intense était observée avec les parasites de phase stationnaire qu'avec ceux de phase de latence ou exponentielle.
- 3-) la cytométrie de flux a permis de confirmer ces résultats en montrant de façon quantitative cette modification de l'expression antigénique de surface des promastigotes de *L. braziliensis*.
- 4-) l'immunoprécipitation des antigènes de surface des promastigotes de *L.b.braziliensis*, marqués à ^{125}I , révèle une bande intense de poids moléculaire 65kDa et une bande faiblement précipitée de poids moléculaire 50kDa; cette protéine de 50kDa représente probablement la forme non réduite de la glycoprotéine majeure de surface décrite dans différentes espèces de *Leishmania* (gp65).

5-) l'infectivité et notamment la survie ainsi que la multiplication intracellulaire des promastigotes de *L. braziliensis* sont fortement inhibées par l'anticorps monoclonal (VD5/25).

En conclusion, nos résultats ont permis d'établir que l'antigène majeur de surface du promastigote de *L. braziliensis* gp65, reconnu par l'anticorps monoclonal (VD5/25), joue un rôle fonctionnel au cours de l'infection.

Il semble que l'expression croissante de la gp65 à la surface des promastigotes représente un mécanisme essentiel pour la survie de *Leishmania* à l'intérieur du macrophage.

L'article N° 3 est présenté page N° 70.

INFECTIVITY OF *Leishmania Braziliensis* PROMASTIGOTES IS DEPENDENT ON THE INCREASING EXPRESSION OF A 65,000-DALTON SURFACE ANTIGEN¹

MAHMOUD KWEIDER, JEAN-LOUP LEMESRE, FRANÇOISE DARCY, JEAN-PIERRE KUSNIERZ, ANDRÉ CAPRON, AND FERRUCCIO SANTORO

From the Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM U. 167, CNRS 624, Institut Pasteur, 59019 Lille Cédex, France

Sequential development of *Leishmania braziliensis* promastigotes from a noninfective to an infective stage was demonstrated. The generation of infective forms was related to their growth cycle and restricted to stationary stage organisms. Using immunofluorescence techniques, we have noticed that the binding of a monoclonal antibody (mAb) against *L. braziliensis* (VD5/25) increased progressively as the promastigotes developed in culture and was maximal with the infective forms. This antigenic differentiation was not detected with an anti-*L. braziliensis* polyclonal rabbit antiserum, suggesting that only a few epitopes, including that recognized by VD5/25, have their expression effectively increased on the surface of infective promastigotes. Immunoprecipitation of lysates of surface-iodinated *L. braziliensis* promastigotes with this mAb revealed two proteins of apparent 65,000 and 50,000 M_r, the 50,000 M_r protein probably representing the unreduced form of the major surface glycoprotein described in several species of *Leishmania* (GP65). The increasing expression of this epitope was not found with *L. chagasi* promastigotes, but seems to occur with the parasites from the *L. mexicana* complex. Intracellular survival of *L. braziliensis* was completely inhibited when the infective promastigotes were treated with VD5/25. It appears, therefore, that the increasing expression of GP65 on the promastigote surface represents an essential mechanism of leishmania survival in the macrophage.

Parasites from the genus *Leishmania* cause a wide range of disease states in man, which includes cutaneous, mucocutaneous, and visceral leishmaniasis. The leishmania cycles and multiplies in two different forms: intracellular nonmotile amastigotes in the phagolysosomes of vertebrate macrophages and extracellular motile promastigotes in the gut of the sandfly vector and in axenic cultures (1). Transformation into amastigotes occurs after surface attachment and entry of promastigotes into cells. Although the mechanisms whereby this protozoa penetrates, differentiates, and survives in macro-

phages is not yet well understood, there are reports indicating that some components present on the surface of promastigotes are involved in the leishmania-macrophage interactions (2-5).

A number of investigators have shown that infectivity of promastigotes is related to their growth phase in culture. Thus, promastigotes from stationary phase were more infective in vivo for experimental animals (6-8) and in vitro for mouse peritoneal macrophages (8, 9) than those from logarithmic (log) phase. The late-stage promastigotes obtained from infected sandflies were also more infective in vivo than the early-stage forms (8, 10). More recently, we and other investigators (9, 11) have reported that the development of infective-stage promastigotes is associated with changes in surface components.

In previous studies on the surface profile of promastigotes from different *Leishmania* species, it has been reported that the major surface component is a glycoprotein of about M_r 65,000 (12-14), namely GP65 (12). GP65 from several leishmanial stocks displayed antigenic and structural homologies (12-16). It was also found as the major surface antigen of the amastigote stage of this parasite (16-18).

Here, by using an IgM monoclonal antibody (mAb)² against GP65, we demonstrate that the development of infective-stage *Leishmania braziliensis* promastigotes is accompanied by a progressive increase in the expression of this antigen on the parasite surface. In addition, this mAb specifically inhibits the infectivity of stationary-phase culture promastigotes to mouse peritoneal macrophages.

MATERIALS AND METHODS

Parasites. Promastigotes of *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/00/LV65) and *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/81/imperatriz) were cultured at 26°C by serial passage of log-phase parasites in monophasic GLSH (glucose, lactalbumin, serum, hemoglobin) medium (19) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Boehringer, Mannheim, West Germany).

Production of mAb. For immunization, BALB/c mice were injected once i.p. and thrice subcutaneously at 1-wk intervals with 0.1% glutaraldehyde-fixed log-phase promastigotes of *L. braziliensis* (10⁷) and were boosted i.v. 3 days before sacrifice with 10⁶ parasites. Fusion between SP2/0 myeloma cells and spleen cells of immunized mice was performed in the presence of polyethylene glycol/dimethyl sulfoxide as described (20, 21). Antibody production was assessed by indirect immunofluorescence (IF) and radioimmunoassay performed with glutaraldehyde-fixed promastigotes (14). Positive colonies were cloned twice by limiting-dilution, and ascites fluids were produced in pristane-primed BALB/c mice. Two mAb reacting with

Received for publication August 7, 1986.

Accepted for publication September 16, 1986.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by the Rockefeller foundation and by Grant TSD-M-010-F(RS) from the European Economic Community.

² Abbreviations used in this paper: mAb, monoclonal antibody; IF, immunofluorescence.

L. BRAZILIENSIS INFECTIVITY IS RELATED TO A 65-kDa ANTIGEN

the surface of *L. braziliensis* promastigotes were used in this investigation: one produced against *L. braziliensis* (VD5/25) and another against *L. chagasi* (HIB1/26) (14). Both were immunoglobulin M (IgM) isotypes as determined by double diffusion in agar gels with the use of a goat serum anti-mouse IgM (μ -chain specific) (Nordic Laboratories, Tilburg, The Netherlands). An anti-filarial IgM mAb (AA3/44) (22) was used as control. These mAb were purified from ascites fluids by molecular-sieve chromatography in AcA 34 (LKB, Bromma, Sweden).

Rabbit antiserum. Polyclonal antiserum to *L. braziliensis* was obtained in a New Zealand White rabbit by repeated subcutaneous injections of 2 mg of the total soluble extract of log-phase culture promastigotes in complete Freund's adjuvant as described (19). Pre-immunization serum from the same rabbit was used as control.

Parasite-macrophage interactions. In vitro infection of mouse peritoneal macrophages with promastigotes was performed as before (9). Briefly, 2.5×10^5 normal resident peritoneal exudate cells from BALB/c mice in RPMI 1640 medium (GIBCO, Auckland, New Zealand) containing 10% (v/v) heat-inactivated FCS, 5 U heparin/ml, 25 mM HEPES, 200 U/ml penicillin, and 200 μ g/ml streptomycin were allowed to adhere to glass coverslips placed in 24-well Costar culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark) at 37°C in 5% CO₂. After 4 hr the nonadherent cells were removed by washing, and the remaining macrophages were infected with promastigotes at an approximate 10:1 parasite to cell ratio. After appropriate incubation periods at 37°C in 5% CO₂, coverslips were fixed with methanol and stained with Giemsa. The binding of promastigotes to the macrophages was examined after a 30-min incubation. At the end of 4 hr, the wells were rinsed with RPMI 1640 to remove free parasites and the cultures were left at 37°C for additional periods (24, 48, and 72 hr). For each experiment, over 500 cells were counted in duplicate to determine the number of parasites per 100 cells and the percentage of macrophages infected. In other experiments, the promastigotes were incubated with different dilutions of mAbs or medium for 1 hr at 4°C and washed twice in RPMI 1640 medium before contact with the macrophages.

Indirect IF antibody assays. Classical IF was performed as described (14). Briefly, 0.1% glutaraldehyde-fixed promastigotes were coated on IF slides (Institut Pasteur, Paris). The slides were air-dried and kept at -20°C until used. Diluted mAb ascites or rabbit antisera were applied to the slides for 30 min at room temperature. After two washes in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3, the slides were incubated for 30 min with fluorescein-conjugated goat IgG anti-mouse IgM (Cappel Laboratories, Cochranville, PA) or sheep IgG anti-rabbit immunoglobulin (Institut Pasteur Production, Marnes la Coquette, France). After washing, the slides were mounted in 50% buffered glycerol and examined under the fluorescence microscope.

For flow microfluorometry analysis. 0.1% glutaraldehyde-fixed promastigotes (3×10^9) from different days in culture were incubated with 200 μ l of ascites fluids at various dilutions for 30 min at 4°C. After two washes in PBS, the parasites were treated with the fluorescein-conjugated goat IgG fraction anti-mouse IgM diluted 1/20 for 30 min at 4°C, washed twice in PBS, and resuspended in 1 ml Hanks'-Wallace medium. Fluorescence intensity was quantified in an Orthocytofluorograph 50 H (Ortho Diagnostic Systems, Westwood, MA) with a focused 488-nm argon laser. Fluorescence signals were recorded to produce a histogram of cells counted vs relative fluorescence intensity after logarithmic amplification (23). Results were expressed either as the value of the peak of fluorescence intensity or as the percentage of fluorescent parasites.

Cell surface iodination. Promastigotes from both logarithmic and stationary growth phase were washed three times in Hanks' balanced salt solution containing 100 U/ml aprotinin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) by centrifugation at $600 \times G$ for 10 min at 4°C. Surface radioiodination was performed as described (24). Briefly, 1 mg of Iodo-Gen (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) was dissolved in 10 ml of chloroform, and 62.5 μ l of this solution were transferred to 5-ml glass tubes. The solvent was evaporated under a stream of N₂, leaving a coating of Iodo-Gen bound to the tube. Subsequently, 10^9 promastigotes in 500 μ l 100 mM of PBS and 0.3 mCi of Na ¹²⁵I from Radiochemical Centre (Amersham, U.K.) were added to the glass tube. After a 10-min incubation in ice, this mixture was transferred to another tube containing 1 ml of 7 mM NaI in PBS to quench the reaction. Free ¹²⁵I was eliminated by washing the parasites three times by centrifugation ($600 \times G$, 10 min, 4°C) with 1 ml of ice-cold PBS containing 1 mg NaI/ml. After washing, 95% of the promastigotes remained viable and actively motile and therefore were assumed to have retained intact surface membranes. Cells were solubilized in a lysis buffer containing 10 mM Tris, 0.5% Nonidet P-40 (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD), and 100 U/ml aprotinin, and were left overnight on agitation at 4°C.

Immunoprecipitation. Radiolabeled promastigote lysates were clarified by centrifugation at $5000 \times G$ for 20 min at 4°C. Samples

(40 μ l) of the supernatants were incubated with 5 μ l of ascites for 3 hr at room temperature with constant agitation. Immune complexes were precipitated with 1 ml of a 10% (w/v) suspension of protein A-Sepharose 4B, previously incubated with a rabbit antiserum against mouse IgM as described (14). Adsorbed antigens were eluted in 60 μ l of electrophoresis sample buffer (2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% sucrose, 0.5% bromophenol blue, 10% β -mercaptoethanol, and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 6.8) and boiled for 3 min. Samples were stored at -70°C until used.

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). SDS-PAGE was carried out in 1-mm-thick 13% polyacrylamide slab gels as described (25). Labeled proteins were identified after autoradiography of the dried gels at -70°C by using Kodak X-Omat RP film (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) and Cronex intensifying screens (Dupont de Nemours, Orsay, France).

RESULTS

Growth cycle-dependent generation of infective *L. braziliensis* promastigotes. Usually, the length of log and stationary phases during the in vitro culture of promastigotes depends on both the media and the growth characteristics of the species studied. For this reason, preliminary experiments were performed to obtain a reproducible growth of *L. braziliensis* promastigotes in culture. With an inoculum of 5×10^5 parasites/ml in 50 ml culture medium used, the parasites remained in dividing stage (log) up to the fifth day of culture and in stationary stage at days 6 and 7 (Fig. 1, line). The lysis phase began after the 7th day.

The interactions between *L. braziliensis* cultured promastigotes taken from various points in their growth curve and normal resident mouse peritoneal macrophages in vitro were investigated at different incubation periods. As shown in Figure 1 (bars), the binding of stationary-phase promastigotes, analyzed after 30 min contact, was significantly higher than that observed with log-phase parasites. In fact, the number of promastigotes attached per macrophage increased continuously during their development in culture, reached a maximal level with 7-day parasites, and decreased when the lysis phase started (eighth-day promastigotes). Moreover, the percentage of macrophages with attached parasites from different days in culture varied between 35% (log phase) and 70% (stationary phase). Similar results were obtained, after a 4-hr incubation, for the uptake of promastigotes by the macrophages (Fig. 2, open bars).

The survival and multiplication of leishmania in the macrophages, infected previously with promastigote populations obtained from different days in culture, was investigated after 24-hr and 48-hr incubation. The infection of macrophages with early-stage promastigotes (1 to

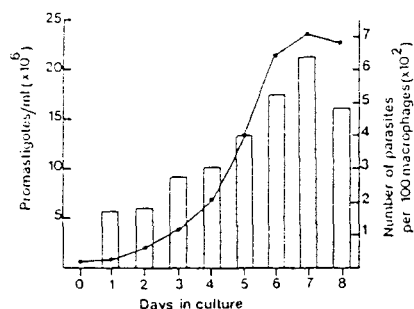


Figure 1. Binding of cultured *L. braziliensis* promastigotes, recovered from various points on their growth curve, to normal resident mouse peritoneal macrophages after 30-min incubation in vitro. For each experiment, over 500 cells were counted in duplicate to determine the number of parasites attached per 100 macrophages (bars).

L. BRAZILIENSIS INFECTIVITY IS RELATED TO A 65-kDa ANTIGEN

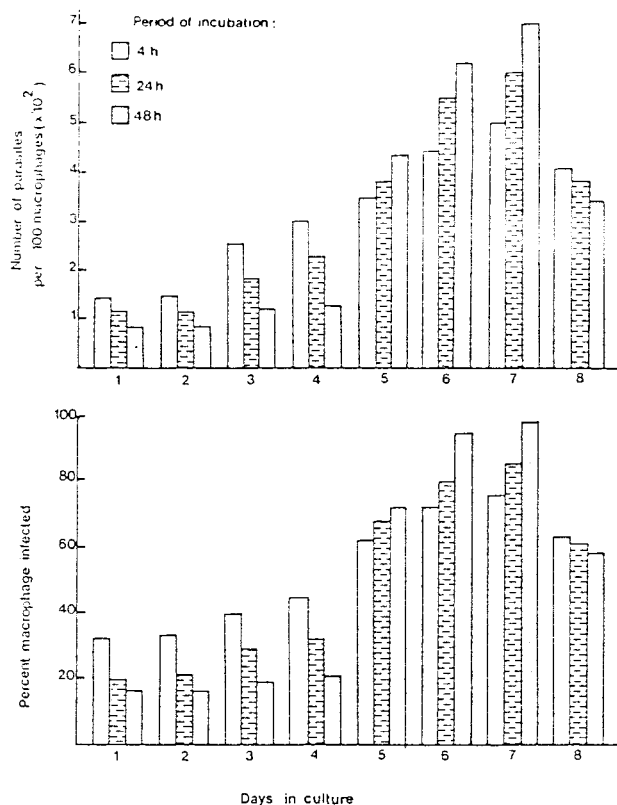


Figure 2. Uptake (4 hr) and survival (24 and 48 hr) of cultured *L. braziliensis* promastigotes, taken from various points in their growth curve, in normal resident mouse peritoneal macrophages. At each time, over 500 cells were counted in duplicate to determine the number of parasites per 100 cells (top) and the percentage of infected macrophages (bottom).

4 days in culture) resulted in an important reduction in the number of intracellular parasites between 4 and 48 hr (Fig. 2, top). At the end of 48 hr, most of the log-phase parasites were killed by the macrophages. An intermediate result was observed with promastigotes derived from 5-day cultures, which showed a slight capacity to multiply into the cells. Optimal survivals were obtained with stationary stage parasites (days 6 and 7). In this case, both the percentage of infected macrophages (Fig. 2, bottom) and the number of amastigotes per cell (top) increased significantly from 4 to 48 hr. These findings indicated that during this period, the *leishmania* derived from 6- to 7-day cultures were able not only to multiply intracellularly but also to infect other macrophages. The infectivity of promastigotes from 8-day cultures diminished slightly, suggesting that at the lytic stage the parasites cannot survive in the cells.

Expression of surface antigens on *L. braziliensis* promastigotes. To evaluate the surface antigenic expression of promastigote populations obtained from the various points on the growth curve, IF techniques and several mAb and polyvalent sera have been used. Results of classical IF with different dilutions of mAb ascites or polyclonal rabbit sera used are indicated in Table I. The IF titers obtained with the anti-*L. braziliensis* IgM mAb (VD5/25) increased progressively as the promastigotes developed in culture and were maximal with those from 7-day stationary-phase cultures. Another IgM mAb produced against *L. chagasi*, IIB1/26, which cross-reacts

TABLE I
Detection of surface antigens on *L. braziliensis* promastigotes from different days in culture by IF

Antibodies	Reciprocal IF Titers with Fixed Promastigotes from Different Days in Culture							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Monoclonal anti-body ascites to								
<i>L. braziliensis</i>	160	160	320	320	640	640	1280	640
<i>L. chagasi</i>	50	80	80	80	80	160	160	80
<i>O. volutus</i>	40*	40	40	40	40	40	40	40
Rabbit antiserum								
<i>L. braziliensis</i>	1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280
Normal rabbit serum	40	40	40	40	40	40	40	40

*No positive reaction was observed at a 1/40 dilution.

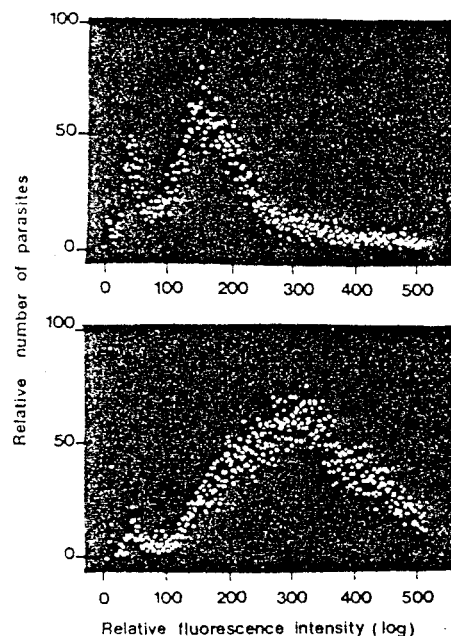


Figure 3. Flow microfluorometry analysis of the binding of the anti-*L. braziliensis* monoclonal antibody (VD5/25) to the surface of 3-day log phase culture promastigotes (top) and 7-day stationary phase parasites (bottom).

with the surface of *L. braziliensis* promastigotes, showed the same titer with the different parasite populations. This same result was observed with the anti-*L. braziliensis* rabbit immune serum. These findings indicate that only a few antigenic determinants have their expression specifically increased on the surface of stationary-stage promastigotes, and among them, that recognized by the anti-*L. braziliensis* mAb.

To quantify the binding of VD5/25 on the surface of promastigotes from different days in culture more completely, we used flow microfluorometry. Representative results in Figure 3 show that the fluorescence intensity with 7-day-old promastigotes (bottom) was significantly higher than that observed with 3-day log-phase parasites (top). In fact, the fluorescence intensity increased during the development of promastigotes in culture and was once again maximal with stationary-phase parasites (Fig. 4). Moreover, the percentage of promastigotes showing a significant VD5/25 binding increased continuously from 69% (day 2) to 94% (day 7). Thus, the epitope recognized by the anti-*L. braziliensis* mAb was more frequently expressed on the surface of infective promastigotes. The

L. Braziliensis INFECTIVITY IS RELATED TO A 65-kDa ANTIGEN

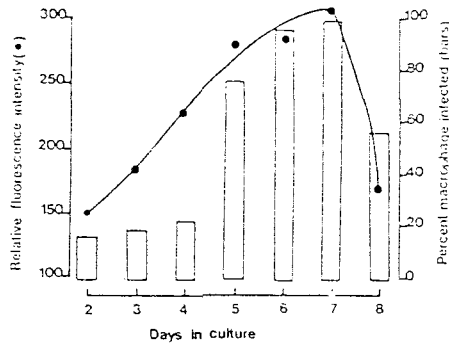


Figure 4. Binding of the anti-*L. braziliensis* monoclonal antibody (VD5/25) to promastigote populations recovered from various points on their growth curve. Results are expressed as the value of the peak of maximal fluorescence intensity as determined by flow microfluorometry. The percentage of macrophages infected after 48-hr incubation is also indicated.

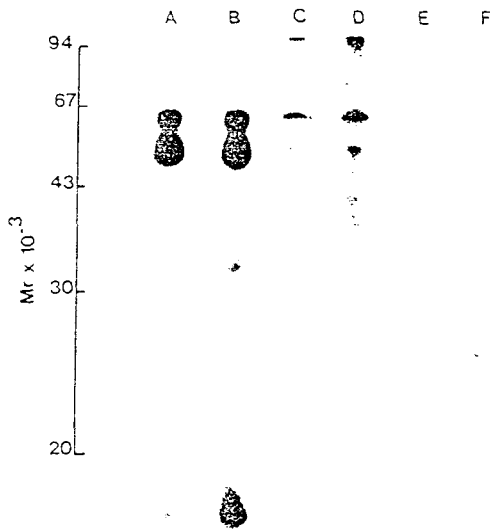


Figure 5. Autoradiographic patterns of ^{125}I -labeled cell surface components of 3-day (A, C, E) and 7-day (B, D, F) cultured *L. braziliensis* promastigotes after separation by SDS-PAGE. Whole cell lysates (A and B); after immunoprecipitation with the anti-*L. braziliensis* monoclonal antibody (VD5/25) (C and D); after precipitation with an unrelated mAb (AA3/44) (E and F).

increasing expression of this epitope during the promastigote maturation in culture seems to be specific of *L. braziliensis*. In fact, although VD5/25 mAb cross-reacts with the surface of *L. chagasi* promastigotes (Lemesre et al., manuscript in preparation), its binding did not change with the different growth stages of this parasite (data not shown).

To characterize the antigen recognized by VD5/25, lysates of surface-iodinated *L. braziliensis* promastigotes were immunoprecipitated with the ascites fluid and analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions. An antigen of M, 65,000 was the most prominent band recognized by our mAb on both 3-day log-phase (Fig. 5C) and 7-day stationary-phase parasites (Fig. 5D). Another band of about M, 50,000, probably corresponding to the non-reduced form of the GP65 previously described (12, 16), was weakly precipitated by VD5/25 in both promastigote populations. Finally, the externally disposed ^{125}I -labeled polypeptide profiles from log-phase and stationary-phase parasites were qualitatively similar (Fig. 5A and B).

TABLE II
In vitro attachment to mouse peritoneal macrophages of *L. braziliensis* promastigotes treated with mAb

Monoclonal Antibodies to	Amount (μg)	Number of Parasites per 100 Macrophages ^a	Percent Macrophages with Attached Parasites
<i>L. braziliensis</i> ^b	600	237	45
	300	241	47
	150	236	56
	60	247	51
<i>L. chagasi</i>	600	352	78
<i>O. volvulus</i>	600	345	70
Control ^c	—	386	77

^a After 30-min incubation at 37°C.

^b Anti-Lb65.

^c No mAb.

Involvement of the surface antigen of *L. braziliensis* promastigotes defined by the anti-*L. braziliensis* mAb in intracellular survival of infective promastigotes. The above results demonstrated that the surface expression of an epitope of the major externally labeled antigen of *L. braziliensis* promastigotes, Lb65, increases during their differentiation from a noninfective to an infective stage. The experiments described below were performed to determine whether the surface expression of this epitope is involved in promastigote infectivity in vitro. For this, we examined the effect of VD5/25 on the promastigote-macrophage interactions. Because at high concentrations the antibody agglutinates the promastigotes (data not shown), preliminary experiments were performed to determine the optimal quantity of mAb to be used in the inhibition studies. Thus, the amounts of the purified IgM mAb indicated in Table II neither agglutinated the parasites nor interfered with their mobility.

For the inhibition experiments, 7-day stationary-phase *L. braziliensis* promastigotes were treated for 1 hr at 4°C with the mAb before incubation with the macrophages in vitro. As shown in Table II, the anti-*L. braziliensis* mAb only partially inhibited parasite attachment to macrophages. Significant inhibition was seen in the number of intracellular parasites. In fact, in incubation periods of from 4 hr to 72 hr, the survival of anti-*L. braziliensis* mAb-treated promastigotes, measured either by the percentage of infected macrophages (Fig. 6, top) or by the number of parasites per cell (Fig. 6, bottom), decreased progressively. At the end of 72 hr most of the parasites were killed, and only 16% of the macrophages exhibited morphologically intact leishmania. The effect of VD5/25 was specific, since both the anti-*L. chagasi* and the anti-*Onchocerca volvulus* mAb did not affect the infectivity of *L. braziliensis* promastigotes. In addition, the interactions between *L. chagasi* infective promastigotes and macrophages (9) were not inhibited by the anti-*L. braziliensis* mAb (data not shown). Finally, as shown in Figure 7, the inhibitory activity of this mAb on the *L. braziliensis* intracellular survival was dependent on the amount of antibody added and was maximal with 600 μg . All these findings suggested that the epitope recognized by VD5/25 on the surface of infective *L. braziliensis* promastigotes is specifically involved in the intracellular survival and multiplication of these parasites.

DISCUSSION

One of the main findings of this study is that the expression of a given epitope from the major surface antigen of *L. braziliensis* promastigotes increases pro-

L. Braziliensis INFECTIVITY IS RELATED TO A 65-kDa ANTIGEN

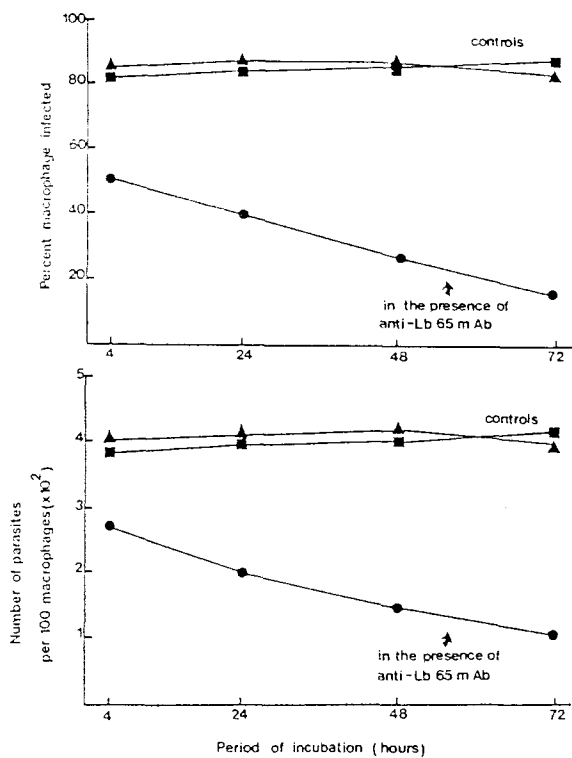


Figure 6. Survival of infective *L. braziliensis* promastigotes (7 days) treated with various mAb in normal mouse resident peritoneal macrophages. For each experiment, over 500 cells were counted in duplicate to determine the percentage of macrophages infected (top) and the number of parasites per 100 cells (bottom). Controls represent infective promastigotes treated with either the anti-*L. chagasi* mAb (▲—▲) or the unrelated AA3/44 mAb (■—■).

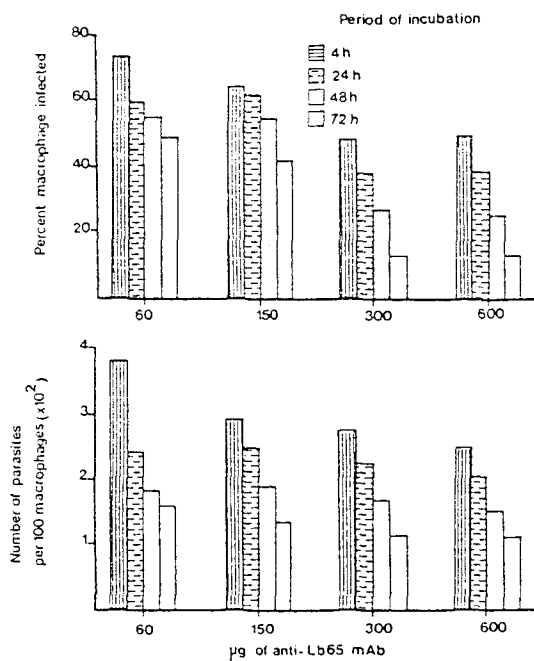


Figure 7. Dose-dependent inhibitory activity of the anti-*L. braziliensis* monoclonal antibody on the survival of infective promastigotes (day 7) in normal mouse macrophages. Results are expressed in both the percentage of macrophages infected (top) and the number of parasites per 100 cells (bottom).

gressively as the parasites differentiate from a noninfective to an infective stage during their growth cycle in culture. This mechanism seems to be essential for leishmania infectivity, since an IgM mAb against the major surface antigen of *L. braziliensis* promastigotes strongly inhibits the intracellular survival of the infective-stage parasites.

In this study, the sequential development of infective promastigotes has been demonstrated with *L. braziliensis* cultured in vitro. As shown with other *Leishmania* species (8, 9), the generation of infective forms was related to the growth cycle and was restricted to nondividing organisms. An in vitro assay was used to examine the ability of the promastigotes to infect normal resident mouse peritoneal macrophages. Several steps of the promastigote-macrophage interactions were studied. Although significant data was obtained for both the attachment and the uptake of infective promastigotes, the best results were seen when the survival and multiplication of the intracellular parasites were analyzed. Therefore, to appreciate correctly the infectivity of promastigotes in vitro, both the percentage of infected macrophages and the number of parasites per cell must be determined at different periods postinfection. In these conditions, only the parasites from stationary-phase cultures multiplied in the macrophages. The sequential development toward an infective promastigote stage of *L. braziliensis* should also occur in the sandfly vector, as observed with other *Leishmania* species (8, 10).

The progressive appearance of infective *L. braziliensis* promastigotes in culture was accompanied by the increasing expression of at least one epitope defined by a mAb on the parasite surface. This antigenic differentiation was not detected with the rabbit antisera produced against the total antigenic extract of *L. braziliensis*. This could be because only a few epitopes, or perhaps only one, have their expression effectively increased on the parasite surface. As our polyclonal rabbit antisera recognize several antigenic components of *L. braziliensis* (Lemesre et al., manuscript in preparation), the difference in the expression of this particular epitope would be hidden or compensated by the other antigenic determinants. Another possibility is that this epitope is not immunogenic to the rabbit. The increasing expression of this epitope was not seen with *L. chagasi* promastigotes. Therefore, our findings cannot be generalized to all *Leishmania* species. However, preliminary data from our laboratory have shown by classical IF that the binding of VD5/25 on the surface of stationary-phase promastigotes from the complex *L. mexicana* is also increased as compared with the log-phase parasites (Kweider et al., manuscript in preparation). It appears that, according to the species studied, at least two mechanisms of surface antigenic change are associated with the development of infective-stage promastigotes: the first, suggested by Sacks et al. (11) in *L. major* and by us (9) in *L. chagasi*, is the appearance of new antigenic components on the parasite surface; the second, described in the present paper with *L. braziliensis* and probably also occurring with *L. mexicana*, is the increasing expression of an epitope already present on the surface of noninfective promastigotes.

This hypothesis is also supported by the immunochemical characterization of the antigens detected on the sur-

L. Braziliensis INFECTIVITY IS RELATED TO A 65-KDa ANTIGEN

face of these different parasites. In the case of *L. major*, a 116.000 M_r antigen was found to be specific of the infective-stage promastigotes (11). However, a surface component with a similar M_r was not detected in any promastigote stage of *L. braziliensis*. What we found was GP65, previously described in several species of *Leishmania*, including *Leishmania major* (12-16). In fact, our results have demonstrated that the epitope detected by V D5/25 on the surface of *L. braziliensis* promastigotes is present in GP65.

Previous studies with mAb have shown that during transformation of *L. mexicana amazonensis* from amastigotes to promastigotes, the expression of a major surface antigen, probably corresponding to GP65, is strongly increased (17). The increasing expression of a similar protein was presently found during the differentiation of *L. braziliensis* from noninfective to infective promastigotes. These findings suggest that the surface expression of GP65 increases continuously in all stages of leishmania differentiation from amastigotes to infective promastigotes when its expression is maximal. The mechanism controlling its expression is unknown. Recent studies on the processing of GP65 have suggested that at least three proteins of closely apposed M_r and with different levels of glycosylation represent the precursors of the mature form (17, 26). In addition, it has been demonstrated that GP65 from *L. major* is an amphiphilic integral membrane protein containing covalently bound myristic acid, which probably anchors the molecule in the membrane (27). Therefore, GP65 is a lipoglycoprotein that can also be found in a hydrophilic form (27). The involvement of GP65 in intracellular parasitism of macrophages was suggested by different experiments. It is resistant to degradation by rat liver lysosomal enzymes (28, 29), and the purified antigen partially inhibits the binding of promastigotes to macrophages (5). In the present investigation, a mAb against GP65 significantly inhibits the survival of intracellular leishmania. Further physicochemical characterization of the epitope recognized by our mAb will probably be useful in elucidating the mechanisms involving GP65 in promastigote-macrophages interactions.

The reason why log-phase promastigotes, which express a similar GP65 on their surface, are uninfected to the macrophages in vitro is unknown. Possibly the number of copies per cell of this antigen is important for their infectivity. One can postulate that a minimal number of copies of GP65 on the parasite surface is required for its intracellular survival. Other mechanisms involving a lipid-containing glycoconjugate (2) or complement components (3, 4) have been suggested to play a role in promastigote attachment to the macrophages. In this study, the inhibitory activity of our IgM mAb was mainly observed after the uptake of the parasites by the cells. Although it has been shown that mouse macrophages have IgM receptors (30), no increased phagocytosis was noticed with the IgM-treated promastigotes. Therefore, the activity of GP65 must be more important at the intracellular level.

Acknowledgments. We are indebted to Dr. D. Le Ray, who generously provided the LV65 strain of *L. braziliensis* and the rabbit immune serum. We also thank Dr. M. Rabinovitch for the critical reading of the manuscript.

We thank Marc Loyens, Didier Deslée, and Marie-Christine Liebart for technical assistance, and Claudine Colson and Marie-France Massard for manuscript preparation.

REFERENCES

1. Pearson, R. D., D. A. Wheeler, L. H. Harrison, and H. D. Kay. 1983. The immunobiology of leishmaniasis. *Rev. Infect. Dis.* 5:907.
2. Handman, E., and J. W. Goding. 1985. The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *EMBO J.* 4:329.
3. Blackwell, J. M., R. A. B. Ezekowitz, M. B. Roberts, J. Y. Channon, R. B. Sim, and S. Gordon. 1985. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *J. Exp. Med.* 162:324.
4. Mosser, D. M., and P. J. Edelson. 1985. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of leishmania promastigotes. *J. Immunol.* 135:2785.
5. Chang, C. S., and K.-P. Chang. 1986. Monoclonal antibody affinity purification of a leishmania membrane glycoprotein and its inhibition of leishmania-macrophage binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:100.
6. Giannini, M. S. 1974. Effects of promastigote growth phase, frequency of subculture, and host age on promastigote-initiated infections with *Leishmania donovani* in the golden hamster. *J. Protozool.* 21:521.
7. Keithly, J. A., and E. J. Bienen. 1981. Infectivity of *Leishmania donovani* primary culture promastigotes for golden hamsters. *Acta Trop. (Basel)* 38:85.
8. Sacks, D. L., and P. V. Perkins. 1984. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 223:1417.
9. Rizvi, F. S., D. Afchain, I. Sherlock, M. Sadigursky, A. Capron, and F. Santoro. 1985. Infectivity of *Leishmania* promastigotes is associated with surface antigenic expression. *Immunol. Lett.* 11:317.
10. Sacks, D. L., and P. V. Perkins. 1985. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sandflies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34:456.
11. Sacks, D. L., S. Hieny, and A. Sher. 1985. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J. Immunol.* 135:564.
12. Lepay, D. A., N. Nogueira, and Z. A. Cohn. 1983. Surface antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Exp. Med.* 157:156.
13. Gardiner, P. R., C. L. Jaffe, and D. M. Dwyer. 1984. Identification of cross-reactive promastigote cell surface antigens of some leishmanial stocks by ¹²⁵I labelling and immunoprecipitation. *Infect. Immun.* 43:637.
14. Lemesre, J. L., F. S. Rizvi, D. Afchain, M. Sadigursky, A. Capron, and F. Santoro. 1985. Sub-species specific surface antigens of promastigotes of the *Leishmania donovani* complex. *Infect. Immun.* 50:136.
15. Etges, R. J., J. Bouvier, R. Hoffman, and C. Bordier. 1985. Evidence that the major surface proteins of three *Leishmania* species are structurally related. *Mol. Biochem. Parasitol.* 14:141.
16. Colomer-Gould, V., L. Galvao Quintao, J. Keithly, and N. Nogueira. 1985. A common major surface antigen on amastigotes and promastigotes of *Leishmania* species. *J. Exp. Med.* 162:902.
17. Fong, D., and K.-P. Chang. 1982. Surface antigenic change during differentiation of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana*: identification by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7366.
18. Handman, E., H. M. Jarvis, and G. F. Mitchell. 1984. *Leishmania major*: identification of stage-specific antigens and antigens shared by promastigotes and amastigotes. *Parasite Immunol.* 6:223.
19. Le Ray, D., D. Afchain, J. Jadin, A. Capron, S. Yasarol, G. Lanotte, and L. Fameree. 1973. Diagnostic immunoelectrophorétique de la leishmaniose viscérale à l'aide d'un extrait antigénique hydrosoluble de *Leishmania donovani*. Résultats préliminaires. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 53:31.
20. Kohler, G., and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495.
21. Galfre, G., S. C. Howe, C. Milstein, G. W. Burscher, and J. C. Howard. 1977. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 266:550.
22. Aggarwal, A., W. Cuna, A. Haque, C. Dissous, and A. Capron. 1985. Resistance against *Brugia malayi* microfilariae induced by a monoclonal antibody which promotes killing by macrophages and recognizes surface antigens. *Immunology* 54:655.
23. Titus, J. A., S. O. Sharrow, and D. M. Segal. 1983. Analysis of Fc (IgG) receptors on human peripheral blood leukocytes by dual fluorescence flow microfluorometry. II. Quantitation of receptors on T cells that express the OKM1, OKT3, OKT4, and OKT8 antigens. *J. Immunol.* 130:1152.
24. Howard, R. J., D. C. Kaushal, and R. Carter. 1982. Radioiodination of parasite antigens with 1,3,4,6-tetrachloro-3,6-diphenylglycoluril

L. Braziliensis INFECTIVITY IS RELATED TO A 65-kDa ANTIGEN

- rodogen) studies with zygotes of *Plasmodium gallinaceum*. *J. Protozool.* 29:114.
25. Laemmli, U. K. 1971. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680.
 26. Chang, C. S., T. J. Inserra, J. A. Kink, D. Fong, and K.-P. Chang. 1986. Expression and size heterogeneity of a 63 kDa membrane glycoprotein during growth and transformation of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18:197.
 27. Bouvier, J., R. J. Etges, and C. Bordier. 1985. Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes. *J. Biol. Chem.* 260:15504.
 28. Chang, K.-P. 1983. Cellular and molecular mechanisms of intracellular symbiosis in leishmaniasis. *Int. Rev. Cytol. (Suppl.)* 14:267.
 29. Chang, K.-P., and D. Fong. 1983. Cell biology of host-parasite membrane interactions in leishmaniasis. *Ciba Found. Symp.* 99:113.
 30. Lay, W. H., and V. Nussenzweig. 1969. Ca⁺⁺-dependent binding of antigen-19S antibody complexes to macrophages. *J. Immunol.* 102:1172.

Article 3Corrélation entre le développement des formes métacycliques de *Leishmania* et l'augmentation de l'expression de l'antigène majeur de surface, gp65.

Dans cet article nous avons étendu le travail précédent concernant *L. braziliensis* aux autres espèces de *Leishmania* responsables de la leishmaniose cutanée ou mucocutanée du nouveau monde: *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana*. Des souris BALB/c ont été utilisées comme modèle d'infection par *L.m.amazonensis*.

Ainsi, nous avons démontré que :

- 1-) Les promastigotes de *L.m.amazonensis* de phase stationnaire sont plus infectieux que ceux de phase de latence ou exponentielle de culture, que ce soit *in vitro* vis-à-vis des macrophages péritonéaux de souris ou *in vivo* chez des souris BALB/c infectées à la patte par 10^7 promastigotes/souris.
- 2-) L'infectivité et notamment la survie intracellulaire des promastigotes de *L. amazonensis* est significativement inhibée par l'anticorps monoclonal (VD5/25).
- 3-) Une seule protéine de poids moléculaire 65kDa a été révélée par l'immunoprécipitation des extraits antigéniques de surface marqués à l' 125 I de toutes les espèces étudiées en utilisant l'anticorps monoclonal (VD5/25).
- 4-) L'immunofluorescence indirecte faisant réagir l'anticorps monoclonal VD5/25 avec des promastigotes de différentes espèces utilisées dans cette étude démontre une réaction plus intense avec les parasites de phase stationnaire qu'avec ceux de phase exponentielle de culture.
- 5-) La technique de cytométrie de flux nous a permis de confirmer les résultats d'immunofluorescence en montrant de façon quantitative la modification de l'expression croissante de l'antigène majeur de surface gp65 reconnu par l'anticorps monoclonal VD5/25.

En conclusion, les résultats obtenus dans ce travail démontrent que le mécanisme de l'expression croissante de l'antigène majeur de surface de promastigotes de *L. braziliensis*, gp65, représente un mécanisme applicable à toutes les espèces de *Leishmania* du nouveau monde responsables des leishmanioses cutanées ou mucocutanées. Ainsi, ce mécanisme d'expression croissante de gp65 peut contribuer à l'infectivité de ces différentes espèces de *Leishmania*, notamment au niveau de la survie et de la multiplication intracellulaire de ces parasites.

L'article N° 4 est présenté page N° 85.

Development of metacyclic *Leishmania* promastigotes is associated with the increasing expression of GP65, the major surface antigen

M. KWEIDER, J. L. LEMESRE, F. SANTORO*,
J. P. KUSNIERZ, M. SADIGURSKY* & A. CAPRON
Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM
U167-CNRS-624, Institut Pasteur, 1 rue du Professeur Calmette, BP
245, 59019 Lille Cedex, France

Accepted for publication 18 January 1989

Summary: Using immunofluorescence techniques and flow microfluorometry analysis, we have demonstrated that the binding of a monoclonal antibody (VD5/25) produced against GP65, the major surface antigen of *Leishmania braziliensis*, increased on the surface of stationary-phase promastigotes from all the New World *Leishmania* species causing mucocutaneous or cutaneous disease as compared with the log-phase parasites. In addition, a sequential development of *Leishmania amazonensis* promastigotes from a non-infective to an infective stage was demonstrated. Indeed, promastigotes in the stationary phase (days 6-7) were found to be far more infective than those in the logarithmic phase of growth (day 3) both *in vitro* for mouse peritoneal macrophages and *in vivo* for BALB/c mice. The intracellular survival and multiplication of *L. amazonensis* were significantly inhibited when infective promastigotes were treated with the VD5/25 monoclonal antibody. The increasing expression of GP65 on the promastigote surface may thus contribute to *Leishmania* infectivity. This seems to represent a characteristic mechanism applicable to all New World *Leishmania* species studied.

Keywords: *Leishmania* promastigotes of New World species, expression of *Leishmania* GP65 surface antigen, monoclonal antibody to *Leishmania* GP65 surface antigen, *Leishmania* promastigote infectivity *in vitro*, *Leishmania* promastigote infectivity *in vivo*, immunofluorescence and flow microfluorometry

Introduction

Parasites from the genus *Leishmania* cause a wide range of disease states in man, which include cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis. The parasite undergoes a cycle between a non-motile intracellular amastigote stage parasitizing the mammalian

* Present address: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Rua Valdemar Falcao, 121 Brotas, 4000 Salvador Bahia, Brazil.

Correspondence: Dr M. Kweider, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM U167-CNRS-624, Institut Pasteur, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France.

M. Kweider et al.

phagocytic cells and a flagellated motile promastigote stage in the midgut of its sandfly vector (Adler 1964). A similar promastigote form develops when parasites are cultured in cell-free medium (Bray 1974).

A number of investigators have shown that infectivity of promastigotes is related to their growth phase in culture, promastigotes from the stationary phase being more infective *in vivo* for experimental animals (Giannini 1974, Sacks & Perkins 1984) and *in vitro* for mouse peritoneal macrophages (Sacks & Perkins 1984, Rizvi *et al.* 1985, Kweider *et al.* 1987). These infective promastigotes taken from stationary-phase cultures are now referred to as 'metacyclic' (Molyneux, Killick-Kendrick & Ashford 1975, Mallison & Coombs 1986).

A basic question arises from our recent study on the incidence of the maturation stage of *L. braziliensis* cultured promastigotes on infectivity (Kweider *et al.* 1987). Is the characteristic described for *L. braziliensis* species applicable to the other New World *Leishmanias* responsible for cutaneous and mucocutaneous disease?

In the present study, by using an IgM monoclonal antibody (MoAb) produced against GP65 of *L. braziliensis*, we demonstrate that the differentiation between a less infective and an infective *Leishmania* promastigote population of *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* and *L. peruviana* is generally related to the increasing expression of the GP65. A critical number of molecules of this antigen on the metacyclic promastigotes may thus contribute to *Leishmania* in-vitro and in-vivo infectivity.

Materials and methods

PARASITES

The following strains of cutaneous and mucocutaneous *Leishmania* species were used throughout this study: *L. braziliensis* (MHOM/BR/72/M1670), *L. panamensis* (MCHO/PA/00/M4039), *L. guyanensis* (MHOM/BR/78/M5378), *L. peruviana* (MHOM/PE/85/FR6), *L. mexicana* (MNYC/BZ/62/M379), *L. amazonensis* (MHOM/VE/76/JAP789).

Some of these were generously provided by Dr D. Le Ray (Institut de Médecine Tropicale, Anvers, Belgium).

The parasites were cultivated in monophasic GLSH medium (Jadin & Le Ray 1969) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) (Boehringer, Mannheim, FRG) at 26°C. At day 0, cultures were inoculated with 5×10^5 promastigotes per ml in 50 ml medium, and parasites were harvested after different periods in culture. The promastigotes were washed three times by centrifugation in Hanks' balanced salt solution (HBSS) supplemented with glucose before use.

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY

For immunization, BALB/c mice were injected once intraperitoneally and thrice subcutaneously at 1-week intervals with 0.1% glutaraldehyde-fixed log-phase promastigotes of *L. braziliensis* (10^7) and were boosted intravenously with 10^6 parasites 3 days before they were killed. Fusion between SP2/0 myeloma cells and spleen cells of immunized mice was performed in the presence of polyethylene glycol/dimethyl sulphoxide as described previously (Köhler & Milsten 1975, Galfre *et al.* 1977). Antibody

Leishmania infectivity is related to GP65

production was assessed by indirect immunofluorescence and radioimmunoassay performed with glutaraldehyde-fixed promastigotes (Lemesre *et al.* 1985). Positive colonies were cloned twice by limiting-dilution, and ascite fluids were produced in pristane-primed BALB/c mice. Two MoAbs reacting with the surface of *Leishmania* promastigotes were used in this investigation: one produced against *L. braziliensis* (VD5/25) and another against *L. chagasi* (IIIB1/26) (Kweider *et al.* 1987). Both were immunoglobulin M (IgM) isotypes as determined by double diffusion in agar gels with the use of a goat serum anti-mouse IgM (μ -chain specific) (Nordic Laboratories, Tilburg, The Netherlands). An antifilarial IgM MoAb (AA3/44) (Aggarwal *et al.* 1985) was used as control. These MoAbs were purified from ascite fluids by molecular-sieve chromatography in ACA 34 (LKB, Bromma, Sweden).

INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ANTIBODY ASSAYS

Classical immunofluorescence was performed as described (Lemesre *et al.* 1985). Briefly, 0.1% glutaraldehyde-fixed promastigotes were coated on immunofluorescence slides (Institut Pasteur, Paris). The slides were air-dried and kept at -20°C until use. Diluted purified MoAbs were applied to the slides for 30 min at room temperature. After two washes in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3, the slides were incubated for 30 min with fluorescein-conjugated goat IgG anti-mouse IgM (Cappel Laboratories, Cochranville, PA, USA). After being washed, the slides were mounted in 50% buffered glycerol and examined under the fluorescence microscope.

FLOW MICROFLUOROMETRY ANALYSIS

Promastigotes fixed in 0.1% glutaraldehyde (4×10^6) from both log- and stationary-phase cultures were incubated with 200 μl of ascite fluids at various dilutions for 30 min at 4°C . After two washes in PBS, the parasites were treated with the fluorescein-conjugated goat IgG fraction anti-mouse IgM diluted 1/20 for 30 min at 4°C , washed twice in PBS, and resuspended in 1 ml Hanks' Wallace medium. Fluorescence intensity was quantified in an orthocytofluorograph 50 H (Ortho Diagnostic Systems, Westwood, MA, USA) with a focused 488 nm argon laser. Fluorescence signals were recorded to produce a histogram of cells counted *vs* relative fluorescence intensity after logarithmic amplification (Laemmler 1971). Results were expressed either as the value of the peak of fluorescence intensity or as the percentage of fluorescent parasites.

IMMUNOPRECIPITATION

Radiolabelled promastigote lysates prepared as described previously (Kweider *et al.* 1987) were clarified by centrifugation at 5000 *g* for 20 min at 4°C . Forty-microlitre samples of the supernatants were incubated with 5 μl of purified MoAbs for 3 h at room temperature with constant agitation. Immune complexes were precipitated with 1 ml of a 10% (v/v) suspension of protein A-Sepharose 4B previously incubated with a rabbit antiserum against mouse IgM as described by Lemesre *et al.* (1985). Adsorbed antigens were eluted in 60 μl of electrophoresis sample buffer (2% sodium dodecyl sulphate (SDS), 10% sucrose, 0.5% bromophenol blue, 10% β -mercaptoethanol, and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 6.8) and boiled for 3 min. Samples were stored at -70°C until use.

M. Kweider et al.

POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (PAGE)

SDS-PAGE was carried out in 1-mm-thick, 13% polyacrylamide slab gels as described by Laemmli (1971). Labelled proteins were identified after autoradiography of the dried gels at -70°C , using Kodak X-omat RP film (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA) and Cronex intensifying screens (Dupont de Nemours, Orsay, France).

ANIMALS

BALB/c mice were reared in our animal facility and used at 6 weeks of age. *Leishmania amazonensis* log-phase and stationary-phase promastigotes were washed twice in RPMI-1640 medium, and 10^7 parasites were incubated subcutaneously into the right hind footpads of BALB/c mice. Footpads were measured weekly with a direct-reading vernier caliper. Values are means \pm s.d. for 12 mice per group.

PARASITE-MACROPHAGE INTERACTIONS

The promastigotes harvested from 3-day-old (logarithmic phase) and 6-7-day-old (stationary phase) cultures were added to the wells containing macrophages at a ratio of 15 promastigotes/cell and incubated at 37°C in 5% CO_2 . At various time intervals (30 min, 4 h, 24 h, 48 h and 72 h) coverslips were fixed with methanol and stained with Giemsa. At the end of 30 min incubation the number of promastigotes attached to the macrophages was counted in 500 cells in duplicate. After 4 h incubation the remaining wells were washed gently to remove the non-adherent promastigotes. The percentage of infected macrophages and the number of amastigotes per 100 cells were counted at the end of 4-, 24-, 48- and 72-h incubation periods. In other experiments, the promastigotes were incubated with different dilutions of MoAb or medium for 1 h at 4°C and washed twice in RPMI-1640 medium before contact with the macrophages.

Results

EXPRESSION OF SURFACE ANTIGENS ON NEW WORLD *LEISHMANIA* SPECIES CAUSING CUTANEOUS AND MUCOCUTANEOUS DISEASE

In our controlled cultures the promastigotes of *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* and *L. peruviana* remained in the active dividing (logarithmic) phase up to the 5th day and in the non-dividing (stationary) phase for the 6th and 7th day (Lemesre *et al.* 1989). Day 3 and day 6 promastigotes were selected for the present study.

To evaluate the surface antigen expression of the promastigote population obtained from both logarithmic and stationary phases, immunofluorescence techniques and several MoAbs had been used. Results of classical immunofluorescence are given in Table 1. The immunofluorescence titres obtained with the anti-Lb65 IgM MoAb (VD5/25), noticeable with the promastigotes from logarithmic-phase cultures, are far higher with those from stationary-phase cultures. These findings indicate that only a few antigenic determinants recognized by the anti-Lb65 MoAb are present on the surface of dividing

Leishmania infectivity is related to GP65

Table 1. Reciprocal immunofluorescence titres with fixed parasites

Parasite	Days in culture	Monoclonal antibody		
		VD5/25	IIIB1/26	AA3/44*
<i>L. guyanensis</i>	3(1)†	2000	2000	40
	6(2)‡	8000	4000	40
<i>L. panamensis</i>	3(1)	1000	4000	40
	6(2)	8000	4000	40
<i>L. peruviana</i>	3(1)	1000	4000	80
	6(2)	4000	8000	80
<i>L. braziliensis</i>	3(1)	2000	2000	40
	7(2)	8000	4000	80
<i>L. mexicana</i>	3(1)	1000	4000	80
	6(2)	8000	8000	80
<i>L. amazonensis</i>	3(1)	1000	4000	80
	6(2)	8000	8000	80
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Epimastigotes	80	2000	80
	Trypomastigotes	80	1000	80
<i>Toxoplasma gondii</i>	—	—	—	—

† (1) Mid-log phase.

‡ (2) Stationary phase.

* Antifilarial MoAb.

promastigote populations, whereas these same antigenic determinants have their expression specifically increased on the surface of stationary-stage infective promastigotes. In contrast, the binding of another IgM MoAb against *L. chagasi* (IIIB1/26), to the GP70 surface antigens of *Leishmania* species, changed less significantly with the different growth stages of the different *Leishmania* species studied (Table 1).

To quantify the binding of VD5/25 on the surface of promastigotes from both logarithmic- and stationary-phase cultures, we used a quantitative flow microfluorometry technique. For all the species studied, representative results (Table 2) showed that the percentages of fluorescent stationary-phase promastigotes are significantly higher than those observed with log-phase parasites. In fact, the fluorescence intensities always increased during the development of promastigotes in culture. The observed increase in the expression of the major surface glycoprotein (GP65) on promastigotes of *L. peruviana* in the infective stationary phase (Figure 1A) compared to the less infective logarithmic phase (Figure 1B) of its growth cycle is a characteristic shared by all New World *Leishmania* species studied (data not shown).

To characterize the antigen recognized by VD5/25, lysates of surface-iodinated stationary-phase promastigotes from *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* and *L. peruviana* were immunoprecipitated with the purified MoAb and analysed by SDS-PAGE under reducing conditions. An antigen of M_r 65000 was the only band recognized by VD5/25 MoAb on all parasites studied (Figure 2).

M.Kweider et al.

Table 2. Binding of the anti-GP65 MoAb (VD5/25) to promastigotes of various *Leishmania* species, recovered from logarithmic-phase or stationary-phase cultures

Parasite	Log-phase (%)	Stationary-phase (%)
<i>L. amazonensis</i>	21	61
<i>L. mexicana</i>	33	56
<i>L. peruviana</i>	28	83
<i>L. panamensis</i>	27	52
<i>L. guyanensis</i>	36	59

Results are expressed as the percentage of fluorescent parasites in each population.

For control, a non-related antiferarial IgM MoAb (AA3/44) was used. Its binding to the promastigotes from all species varied from 3 to 5%.

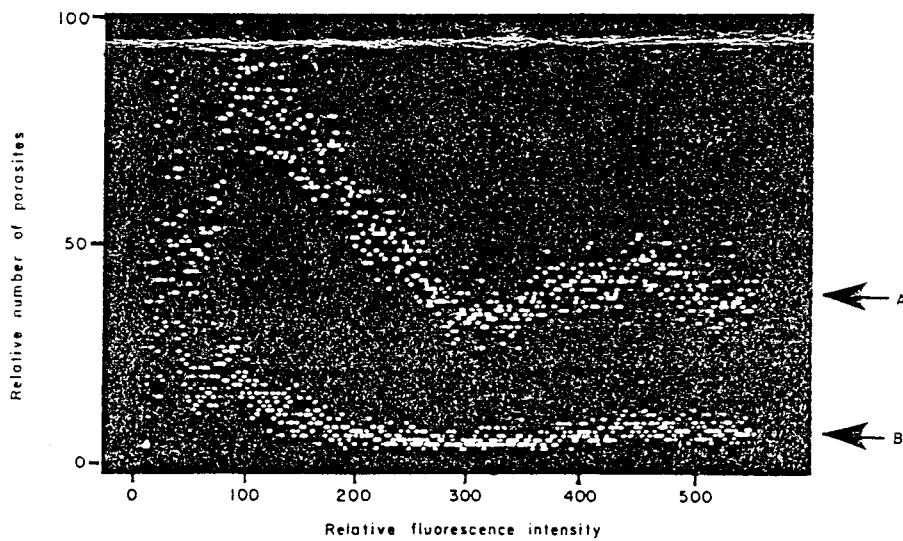


Figure 1. Flow microfluorometry analysis of the binding of the anti-GP65 MoAb (VD5/25) to the surface of the log-phase culture promastigotes (B) and stationary-phase parasites (A) of *L. peruviana*.

PROMASTIGOTE-MACROPHAGE INTERACTIONS

The in-vitro interactions between *L. amazonensis* cultured promastigotes taken from log and stationary phases of their growth curve and normal resident mouse peritoneal macrophages were investigated at different incubation periods (Figure 3). The attachment

Leishmania infectivity is related to GP65

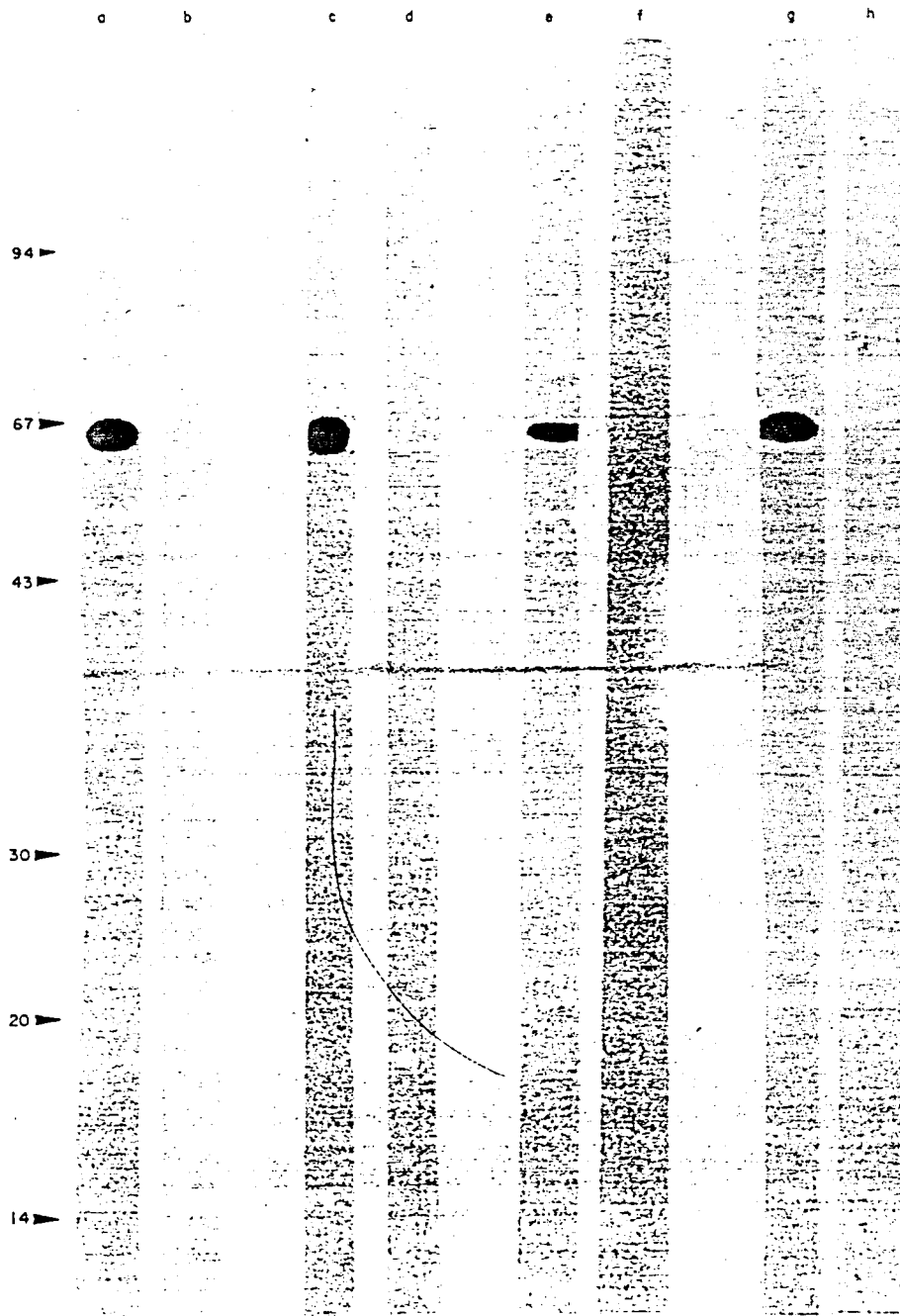


Figure 2. Autoradiographic patterns of ^{125}I -labelled cell surface components of stationary-phase promastigotes of *L. amazonensis* (a), *L. mexicana* (c), *L. guyanensis* (e), *L. panamensis* (g), after immunoprecipitation with the anti-*L. braziliensis* purified MoAb (VD5/25) and separation on SDS-PAGE. In b, d, f and h the same antigens as in a, c, e and g respectively were immunoprecipitated with an unrelated MoAb (AA3/44).

M.Kweider et al.

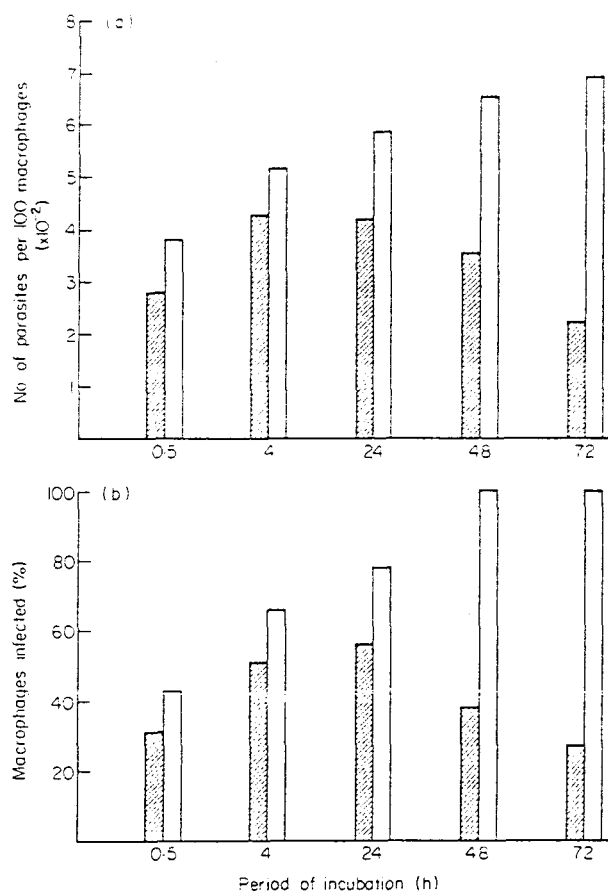


Figure 3. Attachment (30 min), uptake (4 h) and survival (24, 48 and 72 h) of cultured *L. amazonensis* promastigotes taken from both logarithmic, — (▨) and stationary-phases (□) culture in normal resident mouse peritoneal macrophages. At each time point, over 500 cells were counted in duplicate to determine the number of parasites per infected cell (a) and the percentage of infected macrophages (b).

to macrophages of stationary-phase promastigotes after 30 min contact was slightly higher than that observed with log-phase parasites.

Similar results were obtained after a 4-h incubation for the uptake of promastigotes by the macrophages. The survival and multiplication of *Leishmania* in the macrophages was investigated for both populations after 24 h, 48 h and 72 h incubation. The infection of macrophages with log-stage promastigotes (3 days in culture) resulted in an important reduction in the number of macrophages infected between 4 and 72 h (Figure 3b). At the end of 72 h, most of the log-phase parasites had been killed by the macrophages (Figure 3a). Optimal survival and multiplication were obtained with stationary-stage parasites (6–7 days). In this case, both the percentage of infected macrophages (Figure 3) and the number of amastigotes per 100 cells (Figure 3a) increased significantly from 4 to 72 h. These clear-cut findings indicated that during this period the *Leishmania* derived from

Leishmania infectivity is related to GP65

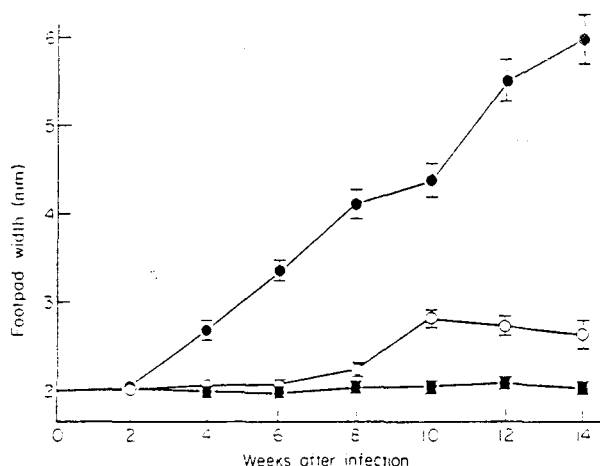


Figure 4. Infectivity of logarithmic- (O) and stationary-phase (●) promastigotes from *L. amazonensis* for BALB/c mice. A total of 10^7 parasites from logarithmic or stationary phase were inoculated subcutaneously into the right hind footpad. Footpads were measured weekly with a direct-reading vernier caliper. Values are means \pm s.d. for 12 mice per group. ■, Non-infected mice.

stationary-phase cultures were able to multiply intracellularly and to infect other macrophages.

The infectivity of logarithmic- and stationary-phase promastigotes *in vitro* was predictive of their virulence in mice. Infection of the footpads of BALB/c mice with 10^7 *L. amazonensis* stationary-phase promastigotes resulted in footpad lesions within 4 weeks (Figure 4). The footpads became greatly enlarged, ulcerated and necrotic from the 8th week onwards. In contrast, after 8 weeks of infection with 10^7 promastigotes from the mid-logarithmic phase (day 3), footpad lesions only began to appear in five out of 12 mice; these lesions were smaller, and did not enlarge after the 10th week.

INVOLVEMENT OF THE SURFACE ANTIGEN OF *L. AMAZONENSIS* PROMASTIGOTES RECOGNIZED BY THE ANTI-LB65 MONOCLONAL ANTIBODY IN INTRACELLULAR SURVIVAL OF INFECTIVE PROMASTIGOTES

The above results have demonstrated that the surface expression of an epitope of the major externally labelled antigen of *L. amazonensis* promastigotes, GP65, increases during their differentiation from a less infective to an infective stage. The experiments described below were performed to determine whether the surface expression of this epitope is involved in promastigote *in vitro* infectivity. We examined the effect of VD5/25 MoAb on the promastigote-macrophage interactions. The amounts of the purified IgM MoAb indicated in Table 3 neither agglutinated the parasites nor interfered with their mobility. Stationary-phase *L. amazonensis* promastigotes were treated for 1 h at 4°C with the MoAb before incubation with the macrophages *in vitro*. As shown in Table 3, only the anti-*L. braziliensis* MoAb partially inhibited the parasite attachment to macrophages. This inhibition was dose dependent. In incubation periods from 4 h to 72 h, the survival of anti-Lb65 MoAb-treated promastigotes, measured either by the percentage of infected

M. Kweider et al.

Table 3. Attachment to mouse peritoneal macrophages *in vitro* of *L. amazonensis* stationary-phase promastigotes treated with MoAbs

MoAb to	Amount ($\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$)	Number of parasites per 100 macrophages*	Per cent macrophage attached*
<i>L. braziliensis</i> †	600	226	58
	300	211	65
	150	300	69
	75	420	70.2
<i>L. chagasi</i> ‡	600	470	75.5
<i>Onchocerca volvulus</i> §	600	491	69.5
Control	0	483	69.2

* After 30 min incubation at 37°C.

† Anti-Lb65 (VD5/25).

‡ IIIB1/26.

§ AA3/44.

|| No antibody.

macrophages (Figure 5a) or by the number of parasites per cell (Figure 5b) progressively decreased. After 72 h, only 20% of the macrophages exhibited morphologically intact *Leishmania* and most of the parasites had been killed. This effect of VD5/25 was specific, since neither the anti-*L. chagasi* IIIB1/26 MoAb nor the anti-*Onchocerca volvulus* MoAb affected the infectivity of *L. amazonensis* promastigotes. In addition, as shown in Figure 6, the inhibitory activity of this MoAb on the *L. amazonensis* intracellular survival was dependent on the amount of antibody added and was maximal with 600 μg .

Discussion

In the present study, a clear differentiation from a poorly infective to an infective population was observed in promastigote cultures of *L. amazonensis*. The generation of infective forms was related to the growth cycle and was restricted to the non-dividing organisms from the stationary phase of culture. Several steps of the promastigote-macrophage interactions were studied *in vitro*. Both the percentage of infected macrophages and the number of parasites per cell have been determined at different periods post-infection. In these conditions, only the parasites from stationary-phase cultures multiplied in the macrophages. The development of an infective promastigote stage of *L. amazonensis* was also observed *in vivo*; indeed, the lesions induced by the non-dividing promastigotes appeared earlier and were significantly larger than those induced by the dividing parasites. These results support those obtained with other *Leishmania* species (Sacks & Perkins 1984, Rizvi *et al.* 1985, Kweider *et al.* 1987). Thus, the *in-vitro* differentiation of promastigotes from a less infective to an infective stage (metacyclic) seems to be a characteristic feature throughout the *Leishmania* genus.

Several studies have shown that the appearance of the infectivity of promastigotes is

Leishmania infectivity is related to GP65

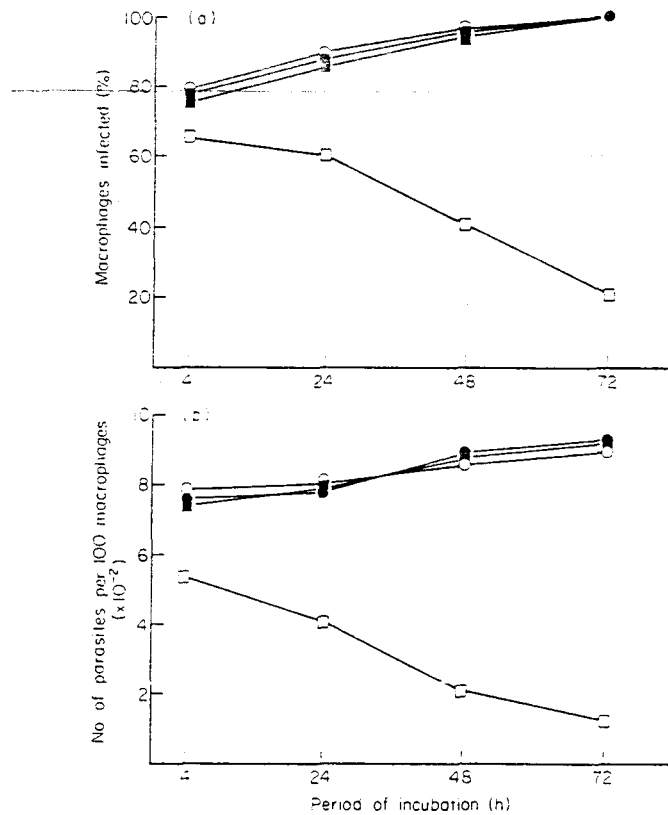


Figure 5. Survival of infective *L. amazonensis* promastigotes (6–7 days) treated with various MoAbs in normal mouse resident peritoneal macrophages. For each experiment, over 500 cells were counted in duplicate to determine the percentage of macrophages infected (a) and the number of parasites per infected cell (b). □, In the presence of anti-Lb65 MoAb. Controls represent infective promastigotes treated with either the anti-*L. chagasi* MoAb (●) or the unrelated AA3/44 MoAb (■) or without MoAb (○).

accompanied by surface antigenic modifications. It appears that, according to the species studied, at least two mechanisms are associated with the development of metacyclic promastigotes: the first, suggested by Sacks & Perkins (1984) in *L. major*, and by our laboratory in *L. chagasi* (Rizvi *et al.* 1985), is the appearance of new antigenic determinants on the surface of stationary-phase parasites; the second, described by us in *L. braziliensis* (Kweider *et al.* 1987), is the increasing expression of an epitope already present on the surface of the non-infective promastigotes taken from logarithmic-phase cultures. This epitope, recognized by an IgM MoAb raised against *L. braziliensis* (VD5/25), is present in GP65, the major surface antigen. Our present data show that this MoAb also recognizes a GP65 antigen in all *Leishmania* species causing mucocutaneous and cutaneous diseases. In this paper, using this MoAb (VD5/25), we have investigated which of the two mechanisms of antigenic modification described above is involved in the *in vitro* differentiation of promastigotes from *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* and *L. peruviana*. The results obtained both by immunofluorescence

M.Kweider et al.

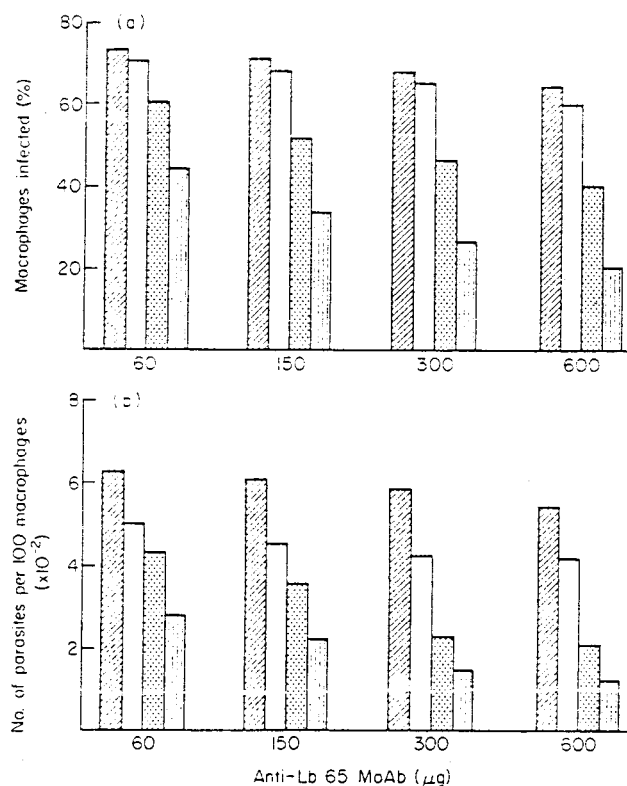


Figure 6. Dose-dependent inhibitory activity of the anti-*L. braziliensis* MoAb on the survival of infective promastigotes of *L. amazonensis* (6–7 days) in normal mouse macrophages. Results are expressed in both the percentage of macrophages infected (a) and the number of parasites per 100 infected cells (b). □, 4 h; □, 24 h; □, 48 h; □, 72 h.

techniques and flow microfluorometry analysis show an increasing expression of the GP65 antigen when the promastigotes shift into the metacyclic forms. Thus, GP65 seems to be a major antigen in all the species listed above; the increase in its expression is correlated with the enhancement of the infectivity of metacyclic promastigotes. In addition, the use of VDS/25 also allowed us to demonstrate for *L. amazonensis* in which step of the parasite-macrophage interaction the GP65 was involved. Indeed, the inhibitory activity of this MoAb was dose dependent and mainly observed after the uptake of the parasites by the cells. Although it has been shown that mouse macrophages have IgM receptors (Lay & Nussenzweig 1969), no increased phagocytosis was noticed with the non-related IgM-treated promastigotes. Therefore, the activity of GP65 seems to be more important at the intracellular level, by allowing the parasites to survive and multiply inside the phagolysosomes, although the way in which GP65 acts is still unclear. Thus, this mechanism appears to be different from that reported by Russel (1987) who showed the implication of GP63 in attachment and uptake of *L. mexicana* promastigotes by macrophages. The present work clearly demonstrates that the increasing expression of this antigen may thus contribute to the protection of the parasites against the hostile activities of the host cells.

Leishmania infectivity is related to GP65

Acknowledgements

We are grateful to Drs F. Darcy and D. Afchain for invaluable help in correction of this manuscript. We also thank Marc Loyens and Didier Deslée for technical assistance, and Claudine Colson and Marie-France Massard for manuscript preparation.

References

- ADLER S. (1964) *Leishmania*. *Advances in Parasitology* **2**, 35
- AGGARWAL A., CUNA W., HAQUE, A., DISSOUS C. & CAPRON A. (1985) Resistance against *Brugia malayi* microfilariae induced by a monoclonal antibody which promotes killing by macrophages and recognizes surface antigen(s). *Immunology* **54**, 655
- BRAY R.S. (1974) *Leishmania*. *Annual Review of Microbiology* **28**, 189
- GALFRE G., HOWE S.C., MILSTEIN C., BURSCHER G.W. & HOWARD J.C. (1977) Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* **266**, 550
- GIANNINI M.S. (1974) Effects of promastigote growth phase frequency of subculture, and host age on promastigote-initiated infections with *Leishmania donovani* in the Golden hamster. *Journal of Protozoology* **21**, 521
- JADIN J.B. & LE RAY D. (1969) Acquisitions récentes dans les techniques de culture des trypanosomes africains. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale* **49**, 331
- KÖHLER G. & MILESTEIN C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495.
- KWEIDER M., LEMESRE J.L., DARCY F., KUSNIERZ J.P., CAPRON A. & SANTORO F. (1987) Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65,000 dalton surface antigen. *Journal of Immunology* **138**, 299
- LAEMMLI U.K. (1971) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680.
- LAY W.H. & NUSSENZWEIG V. (1969) Ca⁺⁺ dependent binding of antigen-19S antibody complexes to macrophages. *Journal of Immunology* **102**, 1172
- LEMESRE J.L., RIZVI F.S., AFCHAIN D., SADIGURSKY M., CAPRON A. & SANTORO F. (1985) Sub-species specific surface antigens of promastigotes of the *Leishmania donovani* complex. *Infection and Immunity* **50**, 136
- MALLINSON D.J. & COOMBS G.H. (1986) Molecular characterization of the metacyclic forms of *Leishmania*. *IRCS Journal of Medical Science* **14**, 557
- MOLINEUX D.H., KILLICK-KENDRICK R. & ASHFORD R.W. (1975) *Leishmania* in phlebotomid sandflies. III. The ultrastructure of *Leishmania mexicana amazonensis* in the midgut and pharynx of *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the Royal Society of London* **190**, 341
- RIZVI F., AFCHAIN D., SHERLOCK I., SADIGURSKY M., CAPRON A. & SANTORO F. (1985) Infectivity of *Leishmania* promastigotes is associated with surface antigenic expression. *Immunology Letters* **11**, 317
- RUSSEL G.D. (1987) The macrophage attachment glycoprotein GP63 is the predominant C₃-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes. *European Journal of Immunology* **164**, 213
- SACKS D.L. & PERKINS (1984) Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* **223**, 11417

Article 4Analyse de la réponse immunitaire suscitée chez la souris vis-à-vis de l'antigène majeur de surface gp65 de promastigote de *L. amazonensis*.

L'implication de la gp65 dans l'infection et l'intérêt présenté par cet antigène nous ont permis d'envisager une étude de la réponse immunitaire suscitée chez la souris vis-à-vis de cette molécule. Le travail présenté dans cet article a consisté à préparer une lignée de lymphocytes T anti-Gp65 de promastigotes de *L. amazonensis*; et à étudier la réponse immunitaire vis-à-vis de cet antigène par le transfert passif de ces cellules T anti-Gp65 et par le transfert de sérums monospécifiques anti-Gp65 à des souris syngéniques infectées par *L. amazonensis*.

Ainsi, nous avons démontré que:

- 1-) le transfert passif de sérum monospécifique anti-Gp65, à des souris syngéniques BALB/c, n' a pas d'incidence sur le développement des lésions induites par *L. amazonensis*.
- 2-) le transfert de lymphocytes T anti-Gp65, juste après leur récupération, à des souris syngéniques infectées 24hr plus tard, induit une protection de l'ordre de 50-60% estimée par la taille des lésions ou par le nombre de parasites/lésion, déterminé par une technique de dilution limite.
- 3-) le transfert passif de lymphocytes T anti-Gp65 après trois semaines en culture, à des souris syngéniques infectées 24hr plus tard par *L. amazonensis*, entraîne une exacerbation de lésions.
- 4-) les tests de prolifération lymphoblastique ont mis en évidence qu' *in vitro*, les promastigotes fixés de *L. amazonensis* induisent une stimulation et une prolifération significative de ces cellules T anti-Gp65.
- 5-) la pré-incubation des macrophages avec les surnageants de culture de ces lymphocytes T a pour conséquence une réduction significative du nombre de parasites intracellulaires, mais n' a que peu d'incidence sur le pourcentage de macrophages infectés.

En conclusion, les lymphocytes T anti-Gp65 jouent un rôle important dans la réponse immunitaire dans la leishmaniose: ces cellules peuvent être protectrices mais de manière variable selon leur phénotype. Ces résultats méritent d'être approfondis.

Analysis of the immune response in immunized BALB/c mice with the
major surface antigen of *L. amazonensis* promastigote.

KWEIDER.M., MAZINGUE.C., COTTREZ-DETOEUF.F., CAPRON.A. & AURIAULT.C.

From the centre d'immunologie et de biologie parasitaire

Unité Mixte Inserm U.167.CNRS 624

INSTITUT PASTEUR

1, Rue Du Professeur A. Calmette

B.P. 245. 59019 Lille cedex (FRANCE)

SUMMARY

T-cell lines specific for the gp65 antigen of *L. amazonensis* promastigote were obtained, and the effect of these T cell populations on the development of cutaneous lesions in normal syngeneic BALB/c mice infected by *L. amazonensis* was examined after i.v transfer. Passive transfer of anti-gp65 T cells just after their recovering from gp65 immunized mice increased the IgG response to gp65 during infection and induced a significant protection against a challenge infection by *L. amazonensis*. In contrast, anti-gp65 T cell lines maintained for three weeks in culture *in vitro*, passively transferred an exacerbation of the lesions while the transfer of anti-gp65 sera had not effect on the infection. Anti-gp65 supernatants obtained after stimulation with glutaraldehyd fixed *L. amazonensis* promastigotes induced a significant intracellular killing of parasites in *in vitro* infected macrophages. These results confirm the importance of T cell-mediated reactions in the protective immunity against leishmaniasis.

INTRODUCTION

A central role for cell-mediated immunity in the control of leishmanial infection has been inferred from experimental approaches. Widespread cutaneous dissemination developed in *L. enriettii* infected guinea pigs when they were immunosuppressed with anti-lymphocyte serum (1). T cell deprivation was found to retard healing and diminish DTH with *L. tropica* infections in thymectomized, irradiated, bone marrow reconstituted CBA mice (2). The importance of host responses in experimental leishmaniasis has been further illustrated in studies in which relatively resistant C57BL mice infected with *L. tropica* were made more susceptible by prior removal of a draining lymph node (3), and in which disease resistance to *L. tropica* in highly susceptible BALB/c mice was increased by low-dose X-irradiation (4). Recently, homogenous populations and clones of T cells responding to *L. major* antigens were found capable of transferring parasite-specific delayed-type hypersensitivity responses to normal syngeneic mice (5). In the same vein, T cell clones specific for *L. donovani* transferring specific DTH responses *in vivo* and producing lymphokines *in vitro*, have been described (6). Titus *et al* showed that the i.v adoptive transfer of *L. major* specific L3T4 positive T cell populations into normal syngeneic BALB/c mice exacerbated cutaneous lesions induced by infection with *L. major* (7). It was demonstrated that murine Th cell clones of the L3T4 phenotype can be divided into two subsets, designated Th1 which secrete IL-2 and IFN- γ , and Th2 secreting IL-4 and IL-5 (8). Scott *et al* reported that two fractions of soluble extract antigens of *L. major* stimulated T lymphocytes and only one fraction was capable of inducing protection against challenge infection (9). Indeed, the cell lines responding to a non protective soluble fraction exacerbated the infection by *L. major* in BALB/c mice, while T cell lines recognizing a protective fraction transferred protective immunity. These protective and exacerbative T cell lines differ in the types of lymphokines produced; protective cell lines secrete IL-2 and IFN- γ while the exacerbative cell lines secrete IL-4 and IL-5. Thus, the protective cell line displayed the Th1 property and the exacerbative cell line had the characteristic of Th2 (10). An important role for gp65, the major surface antigen of *Leishmania*, in the establishment of parasitism by *Leishmania* has

been demonstrated since the pretreatment of macrophages with anti-gp63 antibody inhibits binding of promastigotes to macrophages (11) . In addition, we showed that the infectivity of *Leishmania* increased with the expression of gp65 on the promastigote surface (12). Recently, Russell *et al* reported that the inoculation of liposome incorporated gp63 in BALB/c and CBA/Ca mice induced a strong protection against challenge infection with *Leishmania mexicana mexicana* . Interestingly, the protection could be transferred with T cells to naive mice (13). In the present study, T-cell lines specific for the gp65 of *L. amazonensis* were obtained, and the effect of these gp65-specific T-cell populations on the course of cutaneous lesions in normal syngeneic BALB/c mice induced by *L. amazonensis* was examined after i.v transfer.

MATERIALS AND METHODS

Animals. BALB/c mice were bred in the animal unit of the Institut Pasteur of Lille and used at 8 weeks of age.

Parasites.

Promastigotes of *Leishmania amazonensis* (MHOM/VE/76/JAP78) were cultured at 23°C by serial passage of 5×10^5 /ml mid log-phase parasites in monophasic GLSH medium (14) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum (IFCS) (Boehringer, Mannheim, FRG). The promastigotes were washed three times by centrifugation in Hanks' balanced salt solution (HBSS) supplemented with glucose before use.

Antigen preparation.

Promastigotes from stationary growth phase were washed three times in HBSS containing 100U/ml aprotinin (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) by centrifugation at $6000 \times g$ for 10 min at 4°C. Promastigotes were lysed in a buffer containing 10 mM Tris, 0.5% Nonidet P40 (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD) and 100U/ml aprotinin, and left overnight on agitation at 4°C. Then, promastigote lysates were clarified by centrifugation at $5,000 \times g$ for 20 min at 4°C. Supernatants were concentrated and passed on to a concanavalin A-sepharose (Pharmacia AB, Uppsala, Sweden) column. Elution was done using 20 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 0.1% n-octyl B-D-glucopyranoside (Sigma, St-Louis, USA), $5 \mu\text{M}$ (TLCK), L-1-chlor-3-(4-tosylamido)-7-amino-2-heptanon- hydrochloride (Boehringer, Mannheim, GmbH, W. Germany), $1.5 \mu\text{M}$ leupeptin (Sigma, St-Louis, USA) and 0.5M α -methyl-D-mannoside (Sigma, St-Louis, USA). The eluted material was concentrated and separated by electrophoresis on 13% polyacrylamide slab gels (SDS-PAGE) (15). After electrophoresis, gels were stained with coomassie blue. The stained band corresponding precisely to the gp65 was cut out with a scalpel and transferred to an elution gel. Elution was performed at 40 to 60 V for 6 to 12 h. The migration of the samples was stopped at the 2M NaCl-glycerol layer interface as previously described (16). When the gp65 was eluted into the glycerol layer, samples were removed with a pasteur pipette and dialyzed against water to remove sodium dodecyl sulfate (SDS) and salts. The purity of gp65

fraction was controlled on a 13% polyacrylamide slab gel.

Lymphocyte culture medium.

For all cultures, RPMI-1640 (GIBCO, Courbevoie, France) was supplemented with $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 2-mercaptoethanol (MERCK, Darmstadt, FRG), 2mM L-Glutamine (MERCK), 1mM sodium pyruvate (GIBCO), antibiotics (100 IU/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin) (Specia, Paris, France), 20mM HEPES (N-2 hydroxyethyl-piperazine-N'-2 ethane sulfonic acid) (Sigma, St-Louis, USA) and 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS) (GIBCO).

Solid Phase RadioImmunoAssay Procedure (S.R.I.A). For the detection of anti-gp65 IgG antibodies Microtiter plate wells (microtest flexible assay plate, Falcon, Oxnard, USA) were coated during 48-50 hr at room temperature with $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ of gp65 in 0.015M $\text{Na}_2\text{CO}_3/0.035\text{M}$ NaHCO_3 buffer pH 9.6. A two hour saturation at room temperature was then carried out by addition of 0.1ml PBS (0.1M) containing 3% casein. Plates were washed twice in PBS containing 0.3% casein, then incubated at room temperature for 26 hr with 0.1ml appropriate dilutions of sera; and washed twice in PBS-0.3%casein. A final 12-18 hr incubation with 10^5 cpm ^{125}I -labelled anti-mouse IgG (chloramine T method (17), specific activity : 222KBq/ μg) was performed. After last washes, wells were cut out and counted in a gamma counter (LKB, Broma, Sweden) with a counting efficiency of 60%.

Immunization procedures.

40 μg of purified gp65 was mixed 1:1 with complete freund adjuvant (CFA) and injected into the base of the tail of mice on day 0. On day 15, the mice were reinjected with 30 μg of purified gp65 without adjuvant. Animals were bled and draining lymph nodes were removed on day 20. Control mice were injected with bovine serum albumin (BSA) using the same protocol.

Preparation of specific T lymphocytes.

15 days after the second injection of the purified gp65 kDa antigen, sera were analyzed by immunoblotting to control their monospecificity against the same antigen. Draining lymph nodes were harvested aseptically and lymph node cell suspensions were prepared. T lymphocytes were then separated by passage through a nylon wool column (14) and

maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in lymphocyte culture medium with various fixed-promastigote concentrations of *L. amazonensis*, interleukine-2 (IL-2), and irradiated (20 Grey) splenic antigen-presenting cells (APC) (Philips RT; filter 1.7 A1, 100KV, 8mA), in 24-well plates (Becton Dickinson, Paramus, N.J.). T lymphocytes were prepared 5 days after the last antigenic stimulation and purified on a ficoll gradient. After extensive washings, cells were injected into syngeneic mice.

Western blotting analysis.

Western blotting was carried out on lysates of *L. amazonensis* promastigote antigens separated on 13% SDS-PAGE, then transferred to a nitrocellulose sheet (19). Briefly, antigen blotted papers were incubated with 20µl/ml of sera recovered from mice immunized with gp65, and fixed antibodies were revealed with anti-mouse peroxidase labeled serum (Miles laboratories) as previously described (20).

Procedure of infection.

Mice were infected by subcutaneous injection into the footpad of 10⁷ *L. amazonensis* promastigotes. At various times after infection, the increase in footpad thickness was measured with a caliper. In some experiments, the limiting dilution assay was used for the quantification of *L. amazonensis* in footpads of infected BALB/c mice as described previously (21).

Production of lymphokine-containing supernatants.

Lymphokines were prepared by *in vitro* stimulation of 10⁶ T lymphocytes from gp65 immunized mice, with 2x10⁵ *L. amazonensis* fixed-promastigote per well in the presence of 5x10⁶ syngeneic irradiated (30 Grey, Philips RT, filter 1,7 A1, 100 KV, 8mA) splenic antigen-presenting cells (APC) in lymphocyte culture medium. Supernatants were harvested 72 hr after antigenic stimulation, aliquoted and frozen. T lymphocytes cultured with fixed-promastigotes, T lymphocytes cultured APC and unrelated antigen such as *S. mansoni*, or cultured alone were used as controls.

Parasite-macrophage interactions.

In vitro infection of mouse peritoneal macrophages with promastigotes was performed as described before (22). Briefly, 2.5x10⁵ normal resident peritoneal cells from BALB/c mice

in RPMI 1640 medium (GIBCO, Auckland, New Zealand) containing 10% (V/V) heat-inactivated FCS, 5U heparin/ml, 20mM HEPES, 200U/ml penicillin and 200µg/ml streptomycin were allowed to adhere to tissue culture chamber/slides (Miles scientific, Naperville, IL) at 37°C in 5% CO₂. After 4 hr the nonadherent cells were removed by washing, and the remaining macrophages were treated with 0.5 ml of anti-gp65 T lymphocyte supernatants, for 1 hr before infection with *L. amazonensis* promastigotes at an approximate 5:1 parasite to cell ratio. After 24 hr or 48 hr incubation periods at 37°C in 5% CO₂, chamber/slides were fixed with methanol and stained with Giemsa. For each experiment, over 500 cells were counted to determine the number of parasites per 100 cells and the percentage of infected macrophages. In other experiments, the macrophages were incubated with anti-gp65 T lymphocyte supernatants stimulated with unrelated antigen such as *S.mansoni* antigen for 1 hr before contact with the promastigotes.

Lymphocyte proliferation assays.

5×10^5 T cells and 10^6 APC were cultured with antigens in a total volume of 0.2 ml in flat-bottomed 96 well plates (Falcon). On day 5, 18.5 KBq of tritiated thymidine (³H TdR, specific activity 37 GBq/mM, CEA, France) were added to each well. 18 hr later, the cells were harvested by filtration on fiberglass discs using a multiharvester (Skatron, Norway) and the amount of incorporated (³H) TdR was measured in a liquid scintillation counter (LKB).

Analysis by flow cytofluorometry.

Before passive transfer experiments, the surface phenotype of the cells was controlled by flow cytometry using monoclonal antibodies against T cell subsets: anti-L3T4 and anti-Lyt2 (Seralab, Ltd, Crawley Down, UK). The cells after incubation with the monoclonal antibodies were labelled with fluorescein-conjugated antibodies (Cappel, Wilson Drive, W.Chster, PA). The population of fluorescein-labelled cells was quantified by an automated biological cell analysis 50-H cytofluorograph (Ortho-Instrument, West Wood, M.A.).

Adoptive transfer experiments. *In vivo* transfer of gp65-specific T lymphocytes.

T cells (15×10^6) of gp65 immunized mice were injected i.v (intravenously) in 0.2 ml PBS (PH 7.4) 24 hr before the infection with 10^7 *L.amazonensis* promastigotes. Control mice

were injected i.v with 15×10^6 anti-BSA specific T lymphocytes.

In vivo transfer of anti-gp65 sera. Sera (0.2ml) were injected i.v 24 hr before the infection. Anti-BSA sera were used as controls in these experiments.

RESULTS

Purification of gp65, the major surface antigen of *L.amazonensis* promastigotes.

Promastigote lysates eluted after passage on to a concanavalin A-sepharose column, were separated on 13% polyacrylamide gels. After electrophoresis, gels were stained with coomassie blue. The band corresponding to the gp65 was cut out and eluted. (see materials and methods), its purity was controlled by an analysis on a 13% polyacrylamide slab gel (Fig 1). This purified gp65 molecule was used to immunize BALB/c mice. 15 days after the second injection of gp65 kDa antigen, sera were analyzed by western blot to control their monospecificity against the same antigen (see materials and methods) (Fig 2). As shown under denaturing conditions and in the presence of 2-mercaptoethanol, a band corresponding exactly to gp65 antigen of *L. amazonensis* promastigotes was revealed in anti-gp65 antisera (lane A). A normal mouse serum gave a negative response (lane 2).

Stimulation of gp65-specific T lymphocytes by promastigote antigens.

Lymph node T lymphocytes of BALB/c mice immunized with the gp65 antigen, were assayed in in vitro proliferation assays toward fixed promastigote specific antigens. A significant proliferative response was obtained. As a control, an unrelated antigen such as *S.mansoni* antigen did not induce a significant stimulation of anti-gp65 specific T cells (Fig 3).

Passive transfer of anti-gp65 specific T cells to *Leishmania* infected mice.

The effect of these T-cells on the development of lesions induced by *L.amazonensis* was estimated after their injection into syngeneic BALB/c mice 24 hr before the infection with 10^7 *L.amazonensis* promastigotes in footpads.

When 15×10^6 anti-gp65 specific T cells were transferred just after recovering from the animals (the cytofluorometric analysis of this population indicated that 45% of the nylon wool non adherent cells were L3T4⁺ and 29% were Lyt2⁺), the footpad lesions appeared within 8 weeks of infection while the footpad lesions appeared within 4 weeks of infection in animals receiving 15×10^6 BSA-specific T cells, used as a control. The increase in footpad swelling was also less marked in animals transferred with anti-gp65 T cells compared to controls (Fig 4).

Using the limiting dilution assay, we confirmed that the adoptive transfer of anti-gp65

specific T cells led to a significant decrease in the number of parasites in the footpads as compared with those obtained in the footpads of the control mice (Table 1).

In contrast, when anti-gp65 specific T cells were maintained in culture for three weeks (exogenous IL-2 was added one week after recovering from the animals), the passive transfer of this population enriched in L3T4+ led to an exacerbation of the lesions. Our results, using the limiting dilution assay, demonstrate a substantial increase in the number of parasites in the lesions of the adoptively transferred mice as compared with mice receiving T cell lines specific for an unrelated antigen (BSA) (Table 2).

in vitro Induction of a intracellular killing of parasites by anti-gp65 T lymphocyte supernatants.

The interactions between *L. amazonensis* promastigotes, taken from stationary phase culture, and normal resident mouse peritoneal macrophages *in vitro* were investigated at different periods of infection in the presence of the anti-gp65 T lymphocyte supernatants harvested 72 hr after antigenic stimulation of anti-gp65 T cells (see materials and methods). In fact, macrophages were treated with the supernatant 1 hr before incubation with the promastigotes. As shown in (Table 3) a significant decrease was seen, at 24 hr and 48 hr of infection, in the number of intracellular parasites per cell as compared to control. The percentage of infected macrophages decreased less significantly during the infection.

Passive transfer experiments with anti-gp65 sera.

In order to analyze the role of anti-gp65 antibodies, passive transfer experiments were carried out by injection into BALB/c mice of 0.2ml/mice of anti-gp65 or anti-BSA sera one day before infection with 10^7 *L. amazonensis* promastigotes in footpad. No effect of the anti-gp65 sera was observed as compared with the control group receiving anti-BSA sera (Fig 5).

Helper activity of T cells from donor mice immunized with the gp65 antigen.

The helper activity of the gp65-specific T cells, just after their recovering of animals, was tested after their transfer one day before infection with *L. amazonensis* promastigotes. The animals were bled every 7 days during the experimental infection and the levels of circulating gp65-specific antibodies were identified by S.R.I.A (see materials and methods).

The specific antibody response was significantly enhanced when the mice received 15×10^6 T cells from gp65 antigen-immunized syngeneic donor mice, compared with mice receiving 15×10^6 T cells from syngeneic donor mice immunized with BSA (Fig 6).

Discussion

It was demonstrated that the major surface antigen of *Leishmania*, Gp65, is able to induce appreciable levels of protection in BALB/c and CBA/ca mice (13). In the present study, the components of the humoral and cellular immune response induced in mice against the Gp65 of *L. amazonensis* promastigotes was analyzed by passive transfer experiments:

a) passive transfer of anti-Gp65 sera failed to protect mice against an experimental infection with *L. amazonensis*.

b) a reduction in the number of parasites per lesion of 50 to 60% was obtained when infected mice received the anti-Gp65 T cells just after recovering from gp65 immunized animals.

c) in contrast, when infected mice were passively transferred with anti-Gp65 T cell lines, maintained in culture *In vitro* for three weeks, an exacerbation of footpad lesions was observed.

Taken together, these results showed that, in the mouse model, the anti-Gp65 antibodies were not efficiently involved in the protective mechanisms.

In an attempt to understand the protective effect of anti-Gp65 T cells observed *in vivo*, we have examined if these cells, upon an *in vitro* stimulation with fixed promastigotes of *L. amazonensis*, were able to produce lymphokines inducing the activation of infected macrophages. Our results showed that anti-Gp65 T cells produced lymphokines in response to stimulation with parasite antigens, and thus were able to activate the parasitized macrophages *in vitro* resulting in the killing of the parasite intracellular.

These data demonstrate that the Gp65kDa possesses accessible epitopes capable of activating T cells; these T cells conferred an appreciable protective immunity against a challenge infection by *L. amazonensis*.

A significant observation was the capacity of the transferred anti-Gp65 T cells to enhanced the production of the antibodies directed against the Gp65 during the *L. amazonensis* infection of BALB/c mice. The transfer of unrelated T lymphocytes population did not modify antibody production, confirming *in vivo* the requirement for the specificity of the T cells for the expression of helper activity.

The reason why the anti-Gp65 T cells, maintained three weeks in culture, induce an exacerbation of footpad lesions is unknown.

Titus *et al*, have been demonstrated that a *L. major* specific T cell line induced an exacerbation of lesions in infected mice with *L. major* (7).

Several recent studies have demonstrated that helper T cell clones of the L3T4 phenotype can be divided into two groups, designated Th1 and Th2, based on the lymphokine produced (8,22,23).

Scott *et al*, have been shown that a T cell line established against a protective antigenic fraction of *L. major* transfers protection equivalent to that obtained by active immunization; while T cell line responsive to a non protective antigenic fraction of *L. major* not only failed to protect BALB/c mice against *L. major* infection but exacerbated the infection (10).

It was proposed that the protective cell line displayed the Th1 property of secreting IL-2 and IFN- γ . While the exacerbating line secreted IL-4 and IL-5, a characteristic of Th2 cells (10). Thus, on the basis of our observations, we suggest that the immunization of BALB/c mice with the Gp65kDa antigen may preferentially lead to the development of Th1 type cells. On the other hand, the stimulation *in vitro* of anti-Gp65 T cells with fixed promastigotes of *L. amazonensis* may probably selecte the Th2 type cells. These two hypothesis must be verified by the analyze and the identification of the secreted lymphokines *in vitro* in the supernatant of these T cells.

Because the T cells used in the experiments detailed in this report were populations, it will important to study the effect of cloned anti-Gp65 T cell lines on the developement of lesions induced by *L. amazonensis* in BALB/c mice. It will of importance to developpe the two subsets,Th1 and Th2, of anti-Gp65 T cells which can permit a dissection of the mechanisms involved in the T cell-mediated protection or exacerbation of footpad lesions induced by *L. amazonensis* in BALB/c mice.

References

- 1) Bryceson A.D.M. and Turk J.L. (1971) The effect of prolonged treatment with anti-lymphocyte serum on the course of infections with BCG and *Leishmania enriettii* in the guinea-pig. *J.Pathol.* **104** : 153.
- 2) Preston P.M., Carter L.R., Leuchars E., Davies S.J.A. and Dumond C.D. (1972) Experimental cutaneous leishmaniasis III. effect of thymectomy on the course of infection of CBA mice with *Leishmania tropica* . *Clin. Exp. Immunol.* **10** : 337.
- 3) Poulter L.W. and Randolph C.R. (1982) Mechanisms of immunity to leishmaniasis. Significance of lymphatic drainage from the site of infection. *Clin. Exp. Immunol.* **48** : 396.
- 4) Howard J.G., Hale C. and Liew F.Y. (1980) Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. III. Nature and significance of specific suppression of cell-mediated immunity in mice highly susceptible to *Leishmania tropica* . *J. Exp. Med.* **152** : 594.
- 5) Louis J.A., Lima G.M.C. & Engers H.D.(1982) Murine T lymphocyte responses specific for the protozoan parasites *L.tropica* and *Trypanosoma brucei*. *Clin. Immunol. Allergy.* **2**: 597.
- 6) Sheppard H.W., Scott P.A. and Dwyer D.M. (1983) Recognition of *Leishmania donovani* antigens by murine T lymphocyte lines and clones. Species cross-reactivity, functional correlates of cell-mediated immunity and antigen characterization. *J. Immunol.* **131** : 1446.
- 7) Titus R.G., Lima G.C., Engers H.D. and Louis J.A. (1984) Exacerbation of murine cutaneous leishmaniasis by adoptive transfer of parasite-specific helper T cell populations capable of mediating *Leishmania major* -specific delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol.* **133** : 1594.
- 8) Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A. and Coffman R.L. (1986) Two

types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136** : 2348.

9) Scott P., Pearce E., Natovitz P. and Sher A. (1987) Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. II. Immunologic properties of protective and non-protective subfractions of a soluble promastigote extract. *J. Immunol.* **139** : 3118.

10) Scott P., Natovitz P., Coffman R.L., Pearce E. and Sher A. (1988) Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J.Ex.Med.* **168** : 1675.

11) Russell D.G. and Wilhelm H. (1986) The involvement of Gp63, the major surface glycoprotein, in the attachment of *Leishmania* promastigotes to macrophages. *J. Immunol.* **136** : 2613.

12) Kweider M., Lemesre J.L., Darcy F., Kusnierz J.P., Capron A. and Santoro F. (1987) Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65,000-dalton surface antigen. *J. Immunol.* **138** : 229.

13) Russell. D. G. and Alexander J. (1988) Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *J. Immunol.* **140**: 1274.

14) Le Ray D., Afchain D., Jadin J., Capron A., Yasarol S., Lanotte G. and Fameree L. (1973) Diagnostique immunoelectrophorétique de la leishmaniose viscérale à l'aide d'un extrait antigénique hydrosoluble de *Leishmania donovani*. Résultats préliminaires. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **53**: 31.

15) Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T4. *Nature* (London) **227** : 680.

16) Mendel-Martvig I. (1982) A simple and rapid method for the isolation of peptides from sodium dodecyl sulfate containing polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **121** : 215.

17) Greenwood F.C., Hunter W. and Bolver J.S. (1963) The preparation of I-¹³¹ labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* **89** : 114.

18) Louis J.A., Zubler R.H., Coutinho S.G., Lima R., Behin R., Manuel J. and Engers H.D. (1982) The *in vitro* generation and functional analysis of murine T cell populations and clones specific for a protozoan parasite, *Leishmania tropica*. *Immunol. Rev.* **61** : 215.

19) Towbin H., Staehelin T. and Gordin J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74** : 4350.

20) Pierce R.J. and Capron A. (1987). Western blot : principes et methodologies. In techniques biochimiques d'analyse des antigènes de membranes. Charron D. Ed. *INSERM* (Paris) P.43.

21) Titus R.G., Marchand M., Boon T. and Louis J.A. (1985) A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol.* **7** : 545.

22) Cher D.J. and Mosmann T.R. (1987). Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. *J. Immunol.* **138** : 3688.

23) Cherwinski H.M., Schumacher J.H., Brown K.D. and Mosmann T.R. (1987). Two types of mouse helper T cell clone III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays and monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* **166** : 1229.

Table 1

Effect of the transfer of anti-Gp65 T lymphocytes, just after recovering from the animals, on the course of footpad lesions in mice infected by *L. amazonensis*.

Transfer of	Parasite number/lesion
Anti-Gp65 T-cells	$37.5 \times 10^6 \pm 13 \times 10^6$
Anti-BSA T-cells	$76.3 \times 10^6 \pm 11 \times 10^6$

BALB/c mice (5/group) were infected by s.c injection of 10^7 stationary phase promastigotes of *L. amazonensis* into the right footpad, 24h after the transfer of 15×10^6 anti-gp65 T cells. Control mice received the same number of anti-BSA T cells. The number of parasites in infected mouse footpads was estimated according to the method of Titus *et al.* (21). The number of parasites in lesions was calculated from the frequency of parasites and the weight of infected footpads.

Table 2

Effect of the transfer of anti-Gp65 T cell lines, after three weeks of culture, on the lesions induced in BALB/c mice by *L. amazonensis* promastigotes.

Transfer of	Parasite number/lesion
Anti-Gp65 T cells	$9 \times 10^6 \pm 4 \times 10^6$
Anti-BSA T cells	$2 \times 10^6 \pm 6 \times 10^5$

Development of *L. amazonensis* lesions in BALB/c mice (5/group) following transfer of anti-gp65 T cell lines (10^7 cells) and infection with 10^7 stationary phase promastigotes of homologous parasites. Control mice received 10^7 cells of anti-BSA T cell lines. The number of parasites in infected mouse footpads was estimated by the method of Titus *et al.* (21).

Table 3:

Effect of the anti-gp65 T cell supernatants on the survival of *L. amazonensis* promastigotes in normal mouse resident peritoneal macrophages.

macrophages preincubated with	% of infected macrophages ^a		parasite Nb/100 cells ^a	
	24 h	48 h	24 h	48 h
	Anti-gp65 supernatant ^b	50%	65%	140
supernatant ^c Control	42%	72%	110	230

a): Normal mouse resident peritoneal macrophages were infected *In vitro* with *L. amazonensis* promastigotes (5 parasite/cell ratio). After 24 or 48 hr of incubation over 500 cells were counted to determine the percentage of infected macrophages and the number of parasites per 100 cells.

b): macrophages were treated with anti-gp65 T cell supernatants 1 hr before infection. Supernatants were obtained from anti-gp65 T lymphocytes cultured 5 days *In vitro* in the presence of glutaraldehyde fixed promastigotes.

C): macrophages infected in the presence of anti-gp65 T lymphocyte supernatants stimulated with unrelated antigen such as *S. mansoni* antigen.

LEGEND OF FIGURES

Figure 1:

SDS-PAGE Analysis of the gp65 antigen purified from a crude homogenate of *L. amazonensis* promastigotes.

Figure 2:

Western blot analysis of SDS-soluble *L. amazonensis* promastigote proteins probed either with gp65 antisera (lane A) or with normal mouse sera (lane B).

Figure 3:

In vitro proliferative response of T lymphocytes from mice immunized with the gp65 purified antigen, after stimulation with various concentrations of fixed promastigotes *L. amazonensis*.

Figure 4:

Development of *L. amazonensis* induced lesions in BALB/c mice following the transfer of 15×10^6 T cells from previously gp65 immunized mice (♂). Control mice received the same number of anti-BSA T cells (♀). A total of 10^7 stationary phase promastigotes of *L. amazonensis* were inoculated subcutaneously into the right footpad. Footpads were measured weekly with a direct-reading vernier caliper. Values are means \pm s.d for 5 mice per group.

Figure 5:

Development of *L. amazonensis* lesions in BALB/c mice after transfer of anti-gp65 mouse sera (♂) or anti-BSA mouse sera used as controls (♀) and infection with 10^7 parasites of *L. amazonensis*. Values are means \pm s.d for 5 mice per group.

Figure 6:

Helper effect of anti-gp65 T cells on anti-gp65 antibody production in infected mice. SRIA using gp65 antigen and mouse sera obtained at various times postinfection, after passive transfer of 15×10^6 anti-gp65 T cells, just after recovering from the animals (♂) or 15×10^6 of anti-BSA T cells used as controls (♀).

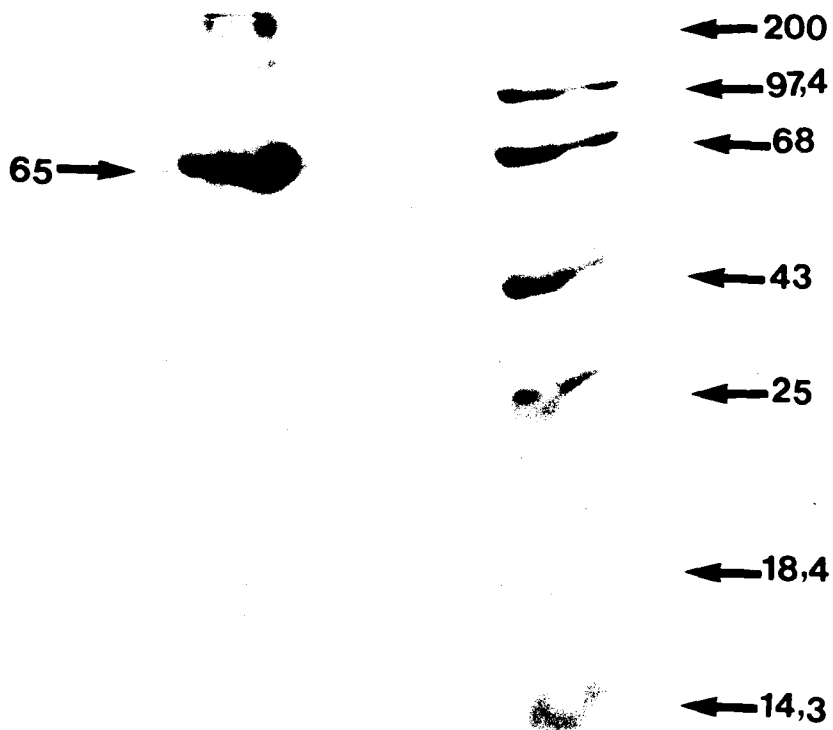


Figure 1

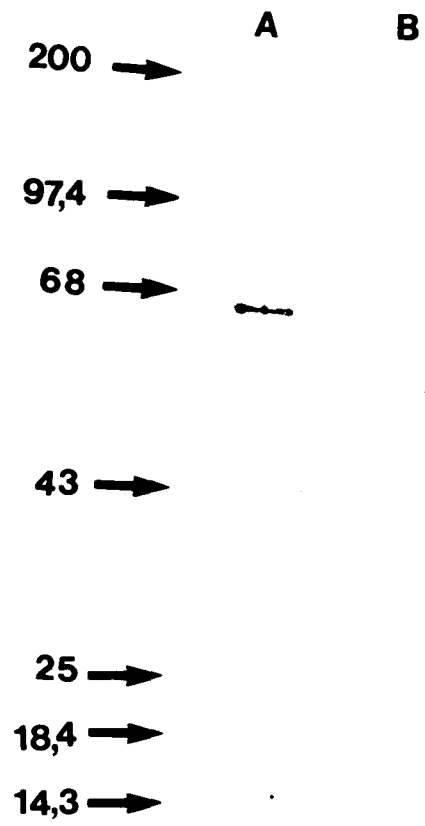


Figure 2

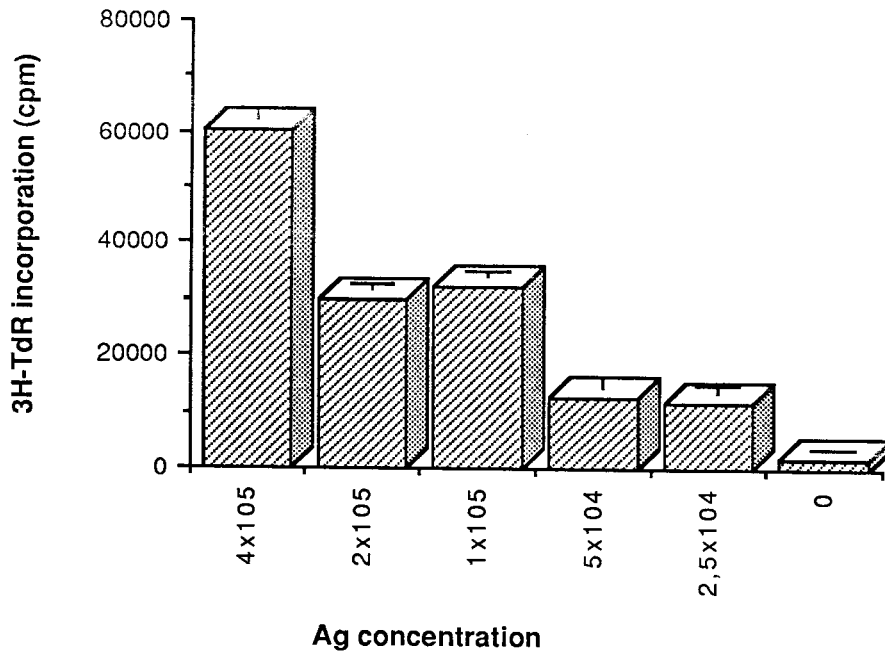


Figure 3

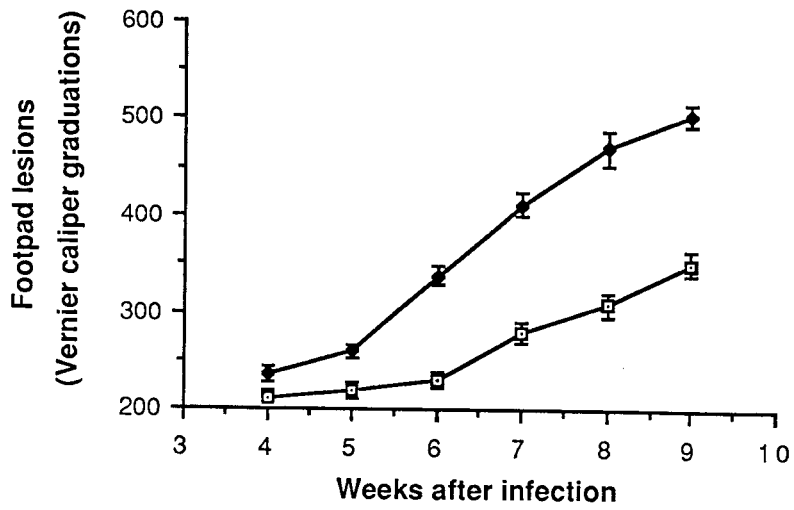


Figure 4

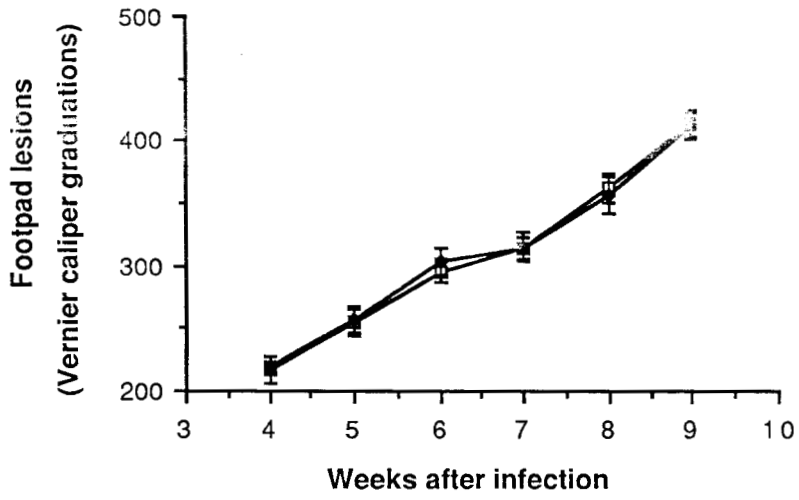


Figure 5

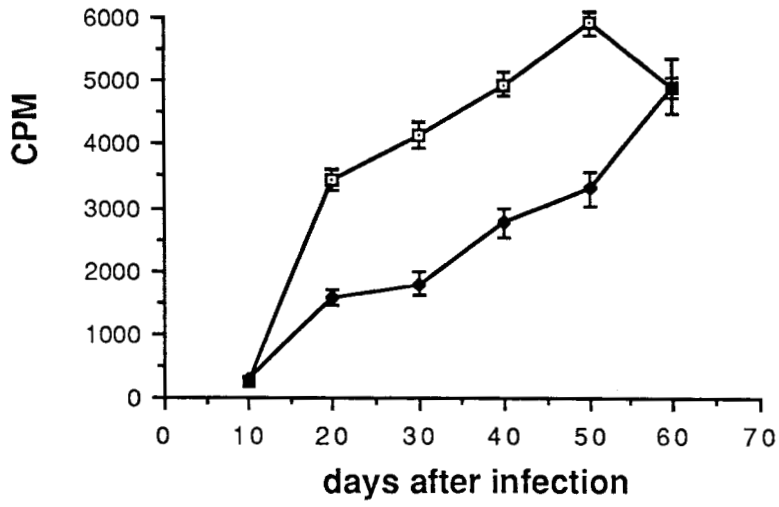


Figure 6

DISCUSSION

DISCUSSION

Nous avons souligné au cours de l'introduction de ce mémoire, le paradoxe que représentent la survie et la multiplication des leishmanies à l'intérieur des macrophages, cellules dont l'une des fonctions est justement de phagocyter les particules étrangères à l'organisme. L'analyse de la relation hôte vertébré-parasite passe donc par une étude des mécanismes qui gouvernent d'une part l'étape d'adhésion et de pénétration du parasite dans le macrophage et d'autre part sa survie intracellulaire.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à un antigène majeur de surface des promastigotes de plusieurs espèces de *Leishmania*, la gp65, décrit par différents auteurs (Fong D. *et al.*, 1982) (Lepay D.A. *et al.*, 1983) (Gardiner P.R. *et al.*, 1984) (Etges R. *et al.*, 1985).

L'expression de cet antigène au cours de la différenciation du parasite ainsi que son rôle dans l'adhésion et la survie intracellulaire ont fait l'objet de la première partie de notre travail. L'intérêt présenté par cette molécule nous a conduit dans un deuxième temps à étudier la réponse immunitaire cellulaire et humorale suscitée chez la souris contre cet antigène.

1. Rôle de la gp65 au cours de l'infection.

Au cours de ce travail, nous avons démontré qu'il est possible en utilisant un milieu et des conditions de culture définis d'obtenir une croissance des leishmanies parfaitement reproductible avec des stades de culture bien individualisés.

L'analyse de l'interaction *in vitro* entre les promastigotes de *L. braziliensis* et *L. amazonensis* et les macrophages péritonéaux de souris, démontre un développement séquentiel de l'infectivité des promastigotes au cours de leur maturation en culture. La génération de formes infectieuses est restreinte aux organismes de phase stationnaire de culture. Ces résultats sont supportés par ceux observés chez d'autres espèces de *Leishmania*

(Sacks D.L. *et al.*, 1984) (Rizvi F.S. *et al.*, 1985). Le développement séquentiel de promastigotes de *L. braziliensis* et *L. amazonensis*, d'un stade non infectant à un stade infectant, devrait se produire *in vivo* chez l'insecte vecteur, comme cela a été observé avec d'autres espèces de *Leishmania* (Sacks D.L. *et al.*, 1984) (Sacks D.L. *et al.*, 1985).

L'apparition progressive de parasites infectieux en culture est accompagnée par un changement antigénique illustré par une expression croissante d'au moins un épitope reconnu à la surface du parasite par un anticorps monoclonal (IgM) VD5/25 anti-Gp65, produit contre un extrait antigénique de *L. braziliensis*. L'utilisation de cet anticorps monoclonal anti-Gp65, nous a permis de démontrer que le phénomène d'expression croissante de la gp65 de surface des promastigotes de *L. braziliensis* se retrouve chez toutes les espèces de *Leishmania* du nouveau monde, responsables des leishmanioses cutanées et mucocutanées.

Il semble qu'il existe, selon les espèces étudiées, deux mécanismes de modification antigénique de surface associés au développement du promastigote vers la forme infectieuse:

- Le premier mécanisme consiste en l'apparition de nouveaux composants antigéniques à la surface du promastigote infectieux de phase stationnaire de culture. Ainsi, il a été démontré que, dans le cas de *L. major* un antigène de 116 kDa, et de 63 kDa dans le cas de *L. chagasi* étaient présents uniquement à la surface du promastigote infectieux de la phase stationnaire de culture et non pas de celui de la phase exponentielle (Sacks D.L. *et al.*, 1985) (Rizvi F.S. *et al.*, 1985).

- Le deuxième mécanisme est illustré par une expression croissante d'un épitope déjà présent à la surface de promastigotes moins infectieux de phase exponentielle de culture. Ce mécanisme est décrit dans notre travail chez les parasites de *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana*.

D'autres études ont également démontré, en utilisant un anticorps monoclonal, qu'au cours de la transformation d'amastigotes de *L. amazonensis* en promastigotes, l'expression d'un antigène majeur de surface augmentait fortement; cet antigène correspond probablement à l'antigène majeur de surface, gp65 (Fong D. *et al.*, 1982).

Ainsi, l'expression de cet antigène de surface, la gp65, semble augmenter de façon continue dans tous les stades de développement de *Leishmania* de la forme amastigote jusqu'au promastigote infectieux chez qui l'expression de gp65 est maximale.

Un rôle central de la gp65, dans l'établissement du parasitisme intracellulaire a été décrit dans plusieurs études. La plupart de ces travaux ont mis en évidence l'implication de cet antigène dans la phase de pénétration et notamment dans l'adhésion des parasites à la surface des macrophages. La gp65 joue un rôle clé dans ces interactions, comme nous l'avons développé dans l'introduction, par le biais des récepteurs pour le troisième composant du complément (C3) (Mosser D.M. *et al.*, 1985) et le récepteur fucose-mannose (Blackwell J.M., 1985) présents à la surface des macrophages. Par ailleurs, l'attachement de *Leishmania* au macrophage peut être inhibé par des anticorps anti-fibronectine (Fn) ce qui démontre l'implication de cette molécule de surface des macrophages dans l'adhésion du parasite (Wyler D.J. *et al.*, 1985).

Dans le même contexte, il a été démontré que des anticorps polyclonaux ou monoclonaux anti-Fn reconnaissent la gp63 de *L. chagasi* et un anticorps monoclonal anti-fragment 15kDa de Fn, contenant la séquence peptidique "Arg-Gly-Asp-Ser" RGDS, reconnaît aussi la gp63 de *L. chagasi* ; ceci a été confirmé par l'utilisation d'un anticorps monoclonal produit contre la séquence synthétique RGDS (RIZVI F.S. *et al.*, 1988). Les mêmes auteurs ont démontré que l'attachement de *L. chagasi* est partiellement inhibé *in vitro* par les mêmes anticorps anti-Fn ou anti-RGDS ou en saturant les récepteurs Fn du macrophage avec différentes séquences peptidiques contenant RGDS.

L'ensemble de ces données démontre l'implication de la gp65 dans l'adhésion du parasite au macrophage.

Alors que l'implication de la gp65 dans l'adhésion du parasite au macrophage apparaît bien documentée, sa contribution à la survie intracellulaire du parasite dans le macrophage reste plus obscure.

Nous avons démontré que le traitement de promastigotes de *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* par l'anticorps monoclonal VD5/25 anti-Gp65, inhibe fortement la survie

intracellulaire des promastigotes infectieux *in vitro*.

Plusieurs études ont démontré que les promastigotes de différentes espèces de *Leishmania* activent le complément de sérum humain normal et fixent à leur surface le C3; cette activation peut induire la lyse de parasites à des concentrations élevées (40%) de sérum tandis qu'à de faibles concentrations (4%), la fixation de C3 conduit à augmenter l'attachement et la pénétration du parasite au macrophage (Pearson R.D. *et al.*, 1989) (Mosser D.M. *et al.*, 1984) (Mosser D.M. *et al.*, 1986).

Une autre étude a démontré une corrélation entre la fixation du (C3), le troisième composant du complément, et la survie intracellulaire de parasites de *L. major* dans les macrophages infectés suggérant ainsi l'implication du C3 dans la survie des parasites à l'intérieur des macrophages. Ce phénomène est attribué en partie à une diminution de l'amplitude de l'activité respiratoire des macrophages déclenchée par la présence de parasites enrobés par le C3 (Mosser D.M. *et al.*, 1987). Or une homologie structurale entre le C3 et la gp63 de *L. mexicana* a été mise en évidence; en effet, la gp63 contient le triplet RGD acides aminés présents aussi dans le C3 (Button L.L. *et al.*, 1988) (Wright S.D. *et al.*, 1987) (Russell D.G., 1987). Cette région de la gp63 ou du C3 est reconnue par le récepteur CR3 du macrophage (Russell D.G. *et al.*, 1988). L'épitope de la gp65 reconnu par l'anticorps monoclonal VD5/25 pourrait se trouver dans la région commune de la gp65 avec le C3 et représenter un élément essentiel pour la survie intracellulaire du parasite.

Le mécanisme par lequel la gp65 peut contribuer à la protection des parasites contre les activités hostiles de cellules hôtes n'est pas encore connu. Néanmoins, l'activité enzymatique de la gp65, pourrait être un facteur de protection des parasites au sein des phagolysosomes de macrophages infectés (Etges R. *et al.*, 1986). En effet, la protéase qui est résistante à la protéolyse et active à la surface du promastigote peut rapidement dégrader les enzymes de l'hôte présentes dans la vacuole des phagolysosomes et par conséquent inactiver la capacité microbicide du macrophage.

En conclusion, il est clair que la gp65 dont l'expression s'accroît avec la maturation du parasite et l'acquisition du pouvoir infectieux joue un rôle central dans l'infection, d'une

part dans l'adhésion du parasite au macrophage en particulier grâce à sa structure "Fibronectine-Like". d'autre part dans la survie intracellulaire du parasite par le biais de l'homologie structurale avec le C3 du complément ou encore via son activité protéasique.

2. Réponse immunitaire vis-à-vis de la gp65.

L'antigène majeur de surface de différentes espèces de *Leishmania*, la gp65, est très immunogène chez l'homme et d'autres animaux. La présence d'anticorps spécifiques de la gp65 dans les sérums de malades atteints de différentes formes de leishmanioses a été bien établie. Ces anticorps ne sont pas protecteurs contre le parasite (Lepay D.A. *et al.*, 1983) (Misle J.A. *et al.*, 1985) (Colomer-Gould V. *et al.*, 1985). Mais on sait peu de choses de la réponse anti-gp65 à médiation cellulaire et de son rôle dans l'immunité protectrice. L'abondance de la gp65 à la surface de *Leishmania*, sa conservation entre les différentes espèces de *Leishmania*, son immunogénicité ainsi que son rôle biologique très important dans l'infection, ont fait, pour nous, de cette molécule un antigène de choix pour étudier la réponse immunitaire chez la souris.

Récemment, Russell *et al.* ont démontré qu'une protection appréciable peut être obtenue, chez des souris BALB/c et CBA/ca, par immunisation directe avec la gp63; cette protection semble être due à l'établissement d'une immunité à médiation cellulaire (Russell D.G. *et al.*, 1988). Au cours de notre travail, nous avons démontré que le transfert passif de sérums monospécifiques anti-Gp65 est incapable de conférer une protection à des souris BALB/c infectées par *L. amazonensis*. Par contre, le transfert passif de cellules T anti-Gp65 de *L. amazonensis* juste après leur recueil, à des souris syngéniques infectées 24 hr plus tard, entraîne une diminution de la taille des lésions de l'ordre de 50%; le nombre de parasites par lésion, déterminé par la technique de dilution limite, est diminué aussi de 60 à 65% en comparaison avec des souris témoins ayant reçu des lymphocytes T sensibilisés contre la sérum albumine bovine.

En revanche, le transfert passif de lymphocytes T anti-Gp65, maintenus en culture *in vitro* pendant trois semaines, à des souris syngéniques infectées 24hr plus tard entraîne une exacerbation des lésions induites par *L. amazonensis*.

Ces résultats s'inscrivent dans la ligne des recherches actuelles montrant l'existence de sous-populations de lymphocytes T de phénotype L3T4⁺ à activités antagonistes. Des études récentes ont démontré que les lymphocytes T "helper" de phénotype L3T4⁺ chez la souris peuvent être divisés en deux sous-populations en fonction des lymphokines qu'elles secrètent; les cellules qui produisent de l'IL-2 et l'IFN- γ sont appelées Th1 tandis que celles qui secrètent l'IL-4 et l'IL-5 sont désignées comme Th2 (Mosmann T.R. *et al.*, 1986).

Dans le cas de la leishmaniose, il semble que les cellules de type Th1 soient des cellules protectrices Tp, (Th1=Tp), et que les cellules de type Th2 soient "exacerbatrices" Te (Th2=Te) dans le sens où elles sont responsables d'une aggravation de la maladie (Locksley M.R. *et al.*, 1987).

Dans ces conditions, on peut supposer que d'une part, les lymphocytes T protecteurs anti-Gp65, transférés juste après leur recueil, sont majoritairement des cellules de type Th1 et que d'autre part la culture *in vitro* a sélectionné des cellules T exacerbatrices "suppressives" de type Th2. Ces hypothèses méritent d'être vérifiées par l'identification des lymphokines produites par ces lymphocytes T anti-Gp65.

Les conditions qui gouvernent l'induction de ces deux types de lymphocytes T de phénotype L3T4⁺, en l'occurrence Th1=Tp et Th2=Tp, sont inconnues. La question de l'existence ou non de répertoires antigéniques distincts pour ces deux sous-populations reste entière.

Scott *et al.* ont sélectionné parmi un extrait total de *L. major*, deux fractions l'une induisant une protection, l'autre non après immunisation active. Le transfert passif des cellules T spécifiques de ces deux fractions induit respectivement les mêmes effets que l'immunisation active, la protection étant liée à des cellules Th1, l'aggravation des lésions à des cellules Th2. Ceci semblerait indiquer que l'antigène lui-même influence la sélection de cellules Th1 ou Th2 (Scott P. *et al.*, 1987).

Cependant, le rôle crucial de la présentation de l'antigène est évident puisque le même antigène injecté par voie intraveineuse i.v ou sous-cutanée s.c induit une réponse cellulaire médiée, respectivement, par des cellules T protectrices de type Th1 ou par des cellules exacerbatrices de type Th2 (Liew F.Y. *et al.*, 1985b).

Dans ce contexte, les résultats obtenus concernant la réponse T anti-gp65 nous amènent à envisager les perspectives de travail suivantes:

1-) Etudier *in vivo* après immunisation par de la gp65 suivant différentes voies ou *in vitro* après différents modes de restimulation la réponse T anti-gp65 et ses conséquences sur le déroulement de l'infection. Les lymphokines produites après activation de ces lymphocytes T seront analysées.

2-) Si comme certaines expériences le suggèrent, les deux types de cellules T L3T4⁺ (Th1, Th2), peuvent reconnaître des épitopes différents, il serait très important de réaliser une analyse des épitopes de l'antigène gp65, de façon à sélectionner le ou les épitopes qui peuvent induire une immunité protectrice médiée par des lymphocytes T de type Th1. L'analyse épitopique de la gp65 peut être effectuée en utilisant des peptides synthétiques de cette molécule.

Une attention particulière sera apportée à l'analyse de la réponse immunitaire vis-à-vis de la séquence peptidique "RGDS" qui est commune entre la fibronectine et la gp65 et impliquée dans l'adhésion de *Leishmania* au macrophage.

En conclusion, ce travail a permis d'une part, de mettre en évidence une corrélation entre le développement séquentiel *in vitro* et *in vivo* de parasites infectieux de *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*, et l'expression croissante de l'antigène majeur de surface de *Leishmania*, la gp65. Le rôle de cet antigène dans l'infection semble s'exercer au niveau de la survie intracellulaire du parasite.

D'autre part, l'analyse de la réponse immunitaire suscitée chez la souris contre la gp65 démontre qu' une protection peut être obtenue dans certaines conditions par le transfert de cellules T anti-Gp65, alors que la réponse immunitaire humorale ne semble pas impliquée.

Ces résultats indiquent d'une part que la gp65 doit être considérée comme un candidat important pour la vaccination vis-à-vis de la leishmaniose et que d'autre part cet antigène constitue un excellent modèle pour étudier les conditions d'induction des sous-population T helper.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adler S. (1964) *Leishmania* . *Adv.Parasitol.* 2: 35.
- Adler S. and Gunders A.E. (1964) Immunity of *Leishmania mexicana* following spontaneous recovery from oriental sore. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 58: 274.
- Alexander J. and Vickerman K. (1975) Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuole of *L. mexicana* -infected macrophages. *J. Parasitol.* 22: 502.
- Alexander J. (1981) *L. mexicana* : inhibition and stimulation of phagosome-lysosome fusion in infected macrophages. *Exp. parasitol.* 52: 261.
- Araujo F.G., Handman E. and Remington J.S. (1980) Binding of lectins to the cell-surface of *Trypanosoma Cruzi*. *J.Protozool.* 27, 397.
- Barbier D., Goyot P. and Dedet J.P.(1985) In French-Guiana *Leishmania braziliensis guyanensis* dermal leishmaniasis : cell-mediated immunity related to clinical features. *J.Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 79, 47.
- Behin R., Mauel J. and Sordat B. (1979) *Leishmania tropica* : pathogenicity and *in vitro* macrophage function in strains of inbred mice. *Exp. Parasitol.* 48: 81.
- Behforouz N.C., Rezai H.R. and Gettner S. (1976) Application of immunofluorescence to detection of antibody in leishmaniasis infection. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 70: 293.
- Behforouz N.C., Wenger C.D. and Mathison B.A. (1986) Prophylactic treatment of BALB/c mice with cyclosporine A and its analog B-5-49 enhances resistance to *Leishmania major*. *J.Immunol.* 136: 3067.
- Berman J.D., Dwyer D.M. and Wyler D.J. (1979) Multiplication of *Leishmania* in human macrophages *in vitro* . *Infect. Immunit.* 26: 375.
- Blackwell J.M., Ezekowitz R.A.B., Roberts M.B., Channon J.Y., Sim R.B. and Gordon S. (1985) Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* . *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 78: 405.
- Blackwell J.M. (1985) Receptors and recognition mechanisms of *Leishmania* species. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79: 606.

- Blackwell J., McMahon-Pratt D., Shaw J. (1986) Molecular Biology of *Leishmania*. *Parasit.Today*. **2** : 45
- Bouvier J., Etges R. and Bordier C. (1985) Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes. *J. Biol. Chem.* **260**: 15504.
- Bradley D.J. (1974) Genetic control of natural resistance to *L. donovani*. *Nature* (London) **250**: 353.
- Bradley D.J. and Kirkley J. (1977) Regulation of *Leishmania* population within the host. II. Genetic control of mice to *L. donovani* infection. *Clin. Exp. Immunol.* **30**: 130.
- Bray R.s. (1970) Serotypes of *Leishmania* in relation to geography and disease states. *Ethiopian Medical Journal.* **8**, 207.
- Bryceson A.D.M., Preston P.M., Bray R.S. and Dumonde D.C. (1972) Experimental cutaneous leishmaniasis. III. Effects of immuno-suppression and antigenic competition on the course of infection with *L. enriettii* in the guinea-pig. *Clin.Exp.Immunol.***10**:305.
- Brumpt E. (1949) *précis de parasitologie. Masson et cie.* Famille des trypanosomides, Genre *Leishmania* . p: **235**.
- Buchmuller Y. and Mauel J. (1979) Studies on the mechanisms of macrophage activation. II. Parasite destruction in macrophages activated by supernatants from concanavalin A-stimulated lymphocytes. *J. Exp. Med.* **150**: 359.
- Champsi J. and McMahon-Pratt D. (1988) Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect. Immunit.* **52**: 3272.
- Chance M.L., Peters W. and Shchory L.(1974) Biochemical taxonomoy of *Leishmania* . I. observations on DNA. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* **68**, 307.
- Chang C.S., Inserra T.J., Kink J.A., Fong D. & Chang K.P. (1986) Expression and size heterogeneity of A 63 kilodalton membrane glycoprotein during growth and transformation of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **18**: 197.

- Chang C.S. and Chang K.P. (1986) Monoclonal antibody affinity purification of a *Leishmania* membrane glycoprotein and its inhibition of *Leishmania* -macrophage binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 100.
- Colomer-Gould V., Galvao Q.L., Keithly J. and Nogueira N. (1985). A common major surface antigen on amastigotes and promastigotes of *Leishmania* species. *J.Exp.Med.* **162**: 902.
- Coombs G.H. (1982) Proteinases of *Leishmania mexicana* and other flagellate protozoa. *Parasitology* . **84**: 149.
- Ebert F., Buse E. and Muhlfordt H. (1979) *in vitro* light and electron microscope studies on different virulent promastigotes of *Leishmania donovani* in hamster peritoneal macrophages. *Z. Parasitenkd.* **59**: 31.
- Edges R.G., Bouvier J. and Bordier C. (1986) The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *J.Biol.Chem.* **261**: 9098.
- Edges R.G., Bouvier J., Hoffman R. and Bordier C. (1985) Evidence that the major surface protein of three *Leishmania* species are structurally related. *Mol. Biochem. Parasitol.* **14**: 141.
- Fong D. and Chang K.P. (1982) Surface antigenic change during differentiation of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana* : identification by monoclonal antibodies . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**: 7366.
- Formmel D., Ogunkolade B.W., Vouldoukis I. and Monjour L. (1988) Vaccine-Induced immunity against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Infect. Immunit.* **56**: 843.
- Gardiner P.R., Jaffe C.L. and Dwyer D.M. (1984). Identification of cross-reactive promastigote cell surface antigens of some leishmanial stocks by ¹²⁵I labelling and immunoprecipitation. *Infect.Immun.* **43**: 637.
- Giannini M.S. (1974) Effects of promastigotes growth phase, frequency of subculture and host age on promastigote-initiated infections with *Leishmania donovani* in the golden hamster. *J.Protozool.* **21**,521.
- Goldestin I.J., Hughes R.C., Monsigny M., Osawa T. and Sharon N. (1980) What should be called a lectin? *Nature* (London) **285**, 66.

- Handman E. and Hocking R.E. (1982) Stage-specific, Strain-specific and cross-reactive antigens of *Leishmania* identified by monoclonal antibodies. *Infect.Immun.* **137**, 28.
- Handman E., Jarvis H.M. and Mitchell G.F. (1984). *Leishmania major* : Identification of stage-specific antigens and antigens shared by promastigotes and amastigotes. *Parasite Immunol.* **6**: 223.
- Holbrook T.W., Cook J.A., Parker B.W. (1981). Immunization against *Leishmania donovani* : glucan as an adjuvant with killed promastigotes. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **30**: 762.
- Hommel M. (1978) The genus *Leishmania* : Biology of the parasites and clinical aspects. *Bull.Inst.Pasteur.* **75**,5.
- Howard J.G., Nicklin S., Hale C., Liew F.Y. (1982) Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis.I. Protection induced in mice genetically vulnerable to fatal *Leishmania tropica* infection. *J.Immunol.* **129**: 2206.
- Howard J.G., Liew F.Y., Hale C. and Nicklin S. (1984) Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. II. Further characterization of the protective immunity against fatal *Leishmania tropica* infection induced by irradiated promastigotes. *J. Immunol.* **134**: 450.
- Jacquemin P. et Jacquemin L.(1980) *Abrégé de parasitologie clinique. Masson.* leishmanies et leishmanioses. p: **40**.
- Jadin J.B. et Le Ray D. (1969) Aquisition récentes dans les techniques de culture des trypanosomes africains. *Ann.soc.Belge.Med.Trop.* **49**,331.
- Killick-kendrick R. (1979) in: Biology of the Kinetoplastida (W.H.R. Lumsden and D.A.Evans, Ed.) *Academic Press*, London, P 395.
- Lelchuk R., Graveley R. and Liew F.Y. (1988) Susceptibility to murine cutaneous leishmaniasis correlates with the capacity to generate interleukin 3 in response to *Leishmania* antigen *In vitro* . *Cell.Immunol.* **111**: 66.
- Lemma A. and Cole L. (1974). *Leishmania enriettii* : Radiation effects and evaluation of radioattenuated organisms for vaccination. *Exp.Parasitol.* **35**: 161.

- Lemesre J.L., Rizvi F.S., Afchain D., Sadigursky M., Capron A. and Santoro F. (1985). Sub-species specific surface antigens of promastigotes of the *Leishmania donovani* complexe. *Infect.Immun.* **50**: 136.
- Lemesre J.L., Rizvi F., Santoro F., Loyens M., Sadigursky M. et Capron A. (1989) Autorégulation de la croissance *in vitro* des *Trypanosomatidae*. *C.R.Acad.Sci. Paris.* **307**, série III, 283.
- Lepay D.A., Nogueira N. and Cohn Z.A. (1983). Surface antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. *J.Exp.Med.* **157**: 1562.
- Le Ray D. (1974) Structures antigéniques de *Trypanosoma brucei brucei* (Protozoa, Kinetoplastida); analyse immuno-électrophorétique et étude comparative. Doctorat-ès-sciences, Louvain, 243.
- Lewis D.H. and Peters W. (1977). The resistance of intracellular *Leishmania* parasites to digestion by lysosomal enzymes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **71**: 295.
- Liew F.Y. and Dhaliwal J.S. (1982) Immunologic regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. V. Characterization of effector and specific suppressor T cells. *J.Immunol.* **128**: 1917.
- Liew F.Y., Hale C., Howard J.G. (1982) Immunologic regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. V. Characterisation of effector and specific suppressor T cells. *J.Immunol.* **128** (4): 1917.
- Liew F.Y., Howard J.G. and Hale C. (1984) Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. III. Protection against fatal *Leishmania tropica* infection induced by irradiated promastigotes involves $Lyt1+2^-$ T cells that do not mediate delayed type hypersensitivity. *J.Immunol.* **132**: 456.
- Liew F.Y., Hale. C. and Howard J.G. (1985). Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. IV. Subcutaneous immunization prevents the induction of protective immunity against fatal *Leishmania major* infection. *J.Immunol.* **135**: 2095.
- Liew F.Y., Singleton A., Cillari E. and Howard J.G. (1985). Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. V. Mechanism of the anti-protective blocking effect

- induced by subcutaneous immunization against *Leishmania major* infection. *J.Immunol.* **135**: 2102.
- Locksley M.R., Heinzl F.P., Sadick M.D., Holaday B.J. and Gardner K.D.Jr. (1987) Murine cutaneous leishmaniasis: Susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann. Ins. Pasteur/Immunol.* **138**: 744.
- Louis J.A., Pedrazzini T., Titus R.G., Muller I., Farrell J.P., Kindler V., Vassalli P., Marchal G. & Milon G. (1987) Subsets of specific T cells and experimental cutaneous leishmaniasis. *Ann.Ins.Pasteur/Immunol.* **138**: 755.
- Louis J.A., Lima G.M.C. and Engers H.D. (1982). Murine T lymphocyte responses specific for the protozoan parasites *Leishmania tropica* and *Trypanosoma brucei*. *Clin. Immunol. Allergy.* **2**: 597.
- Marin F., Delomas J.G., Penarrubia M.P.G. and Penalver J. (1982) Cultivation of *Leishmania*: comparison of different media for amastigote cultivation. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* **6**: 607.
- Mazingue C., Cottrez-Detoeuf F., Louis J., Kweider M., Auriat C. and Capron A. (1989) *in vitro* and *in vivo* effects of interleukin 2 on the protozoan parasite *Leishmania*. *Eur.J.Immunol.* **19**: 487.
- McMahon-pratt D. and David J.R. (1981) Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. *Nature* (London) **291**, 581.
- McMahon-pratt D., Bennet E. and David J.R. (1982) Monoclonal antibodies that distinguish subspecies of *Leishmania braziliensis*. *J.Immunol.* **129**, 926.
- Menzel S. and Bienzle U. (1978) Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis of the old world. *Trop. Med. Parasit.* **29**: 194.
- Milon G., Titus R.G., Cerottini J.C., Marchal G. and Louis J.A. (1986) Higher frequency of *Leishmania major* -specific L3T4⁺ T cells in susceptible BALB/c as compared with resistant CBA mice. *J.Immunol.* **136**: 1467.
- Mitchell G.F., Handman E. and Spithill T.W. (1984) Vaccination against cutaneous leishmaniasis in mice using nonpathogenic cloned promastigotes of *L. major* and importance of route of injection. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **62**: 145.

- Mosser D.M. and Edelson P.J. (1984) Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *J.Immunol.* **132**: 1501.
- Mosser D.M. and Edelson P.J. (1985) The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J.Immunol.* **135**: 2785.
- Mosser D.M., Burke S.K., Coutavas E.E., Wedgwood J.F. and Edelson P.J. (1986) *Leishmania* species: Mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes. *Exp. Parasitol.* **62**: 394.
- Mosser D.M. and Edelson P.J. (1987) The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature.* **327**: 329.
- Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A. and Coffman R.L. (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.* **136**: 2348.
- Murray W.H., Masur H. and Keithly J.S. (1982) Cell mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. I: Correlation between resistance to *L. donovani* and lymphokine generating capacity. *J.Immunol.* **129** (1): 344.
- Murray W.H., Rubin B.Y. and Rothermel C.D. (1983) Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon- γ is the activating lymphokine. *J.Clin.Invest.* **72**: 1506.
- Murray W.H., Spitalny L.G. and Nathan F.C. (1985) Activation of mouse peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo* by interferon- γ . *J.Clin.Inest.* **90**: 1532.
- Nancy C.A., Meltzer M.S., Leonard E.J. and Wyler D.J. (1981) Intracellular replication and lymphokine-induced destruction of *Leishmania tropica* in C3H/HeN mouse macrophages. *J.Immunol.* **127** (6) : 2381.
- Pearson R.D. and Steigbigel R.T. (1980) Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani* . *J.Immunol.* **25**: 2195.

- Preston P.M., Carter R.L., Leuchars E., Davies A.J. and Dumonde D.C. (1972) Experimental cutaneous leishmaniasis. III. Effects of thymectomy on the course of infection of CBA mice with *Leishmania tropica*. *Clin. Exp. Immunol.* **10**: 337.
- Preston P.M. and Dumonde D.C. (1976) Experimental cutaneous leishmaniasis. V. Protective immunity in subclinical and self-healing infection in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.* **23**: 123.
- Pupkis M.F. and Coombs G.H. (1984) Purification and characterization of proteolytic enzymes of *Leishmania mexicana mexicana* amastigotes and promastigotes. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 2375.
- Reed S.G., Andrade Z.A., Roters S.B., Inverso J.A. and Sadigursky M. (1986) *Leishmania mexicana amazonensis* infection in "resistant" inbred mice following removal of the training lymph node. *Clin. Exp. Immunol.* **64**: 8.
- Rezai H.R., Farrell J., Soulsby E.L. (1980) Immunological responses of *Leishmania donovani* mice infected and significance of T cells in resistance to experimental leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* **40**: 508.
- Rioux J.A., Golvan Y.J., Houin R., Croset H. et Tour S. (1970) Résultats d'une enquête écologique sur le foyer leishmanien des cévennes méridionales. *Revue de Médecine.* **18**: 10
- Rizvi F.S., Afchain D., Sherlock I., Sadigursky M., Capron A. and Santoro F. (1985). Infectivity of *Leishmania* promastigotes is associated with surface antigenic expression. *Immunol.Lett.* **11**: 317.
- Rizvi F.S., Ouaiissi M.A., Marty B., Santoro F. & Capron A. (1988) The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a fibronectin-like molecule. *Eur.J.Immunol.* **18**: 473.
- Russell D.G. and Wilhelm H. (1986) The involvement of the major surface glycoprotein (Gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J.Immunol.* **136**: 2613.
- Russell D.G. (1987) The macrophage attachment glycoprotein Gp63 is the predominant C3-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes. *Eur. J. Biochem.* **164**: 213.

- Russell D.G. and Alexander J. (1988) Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *J.Immunol.* **140**: 1274.
- Russell D.G. and wright S.D. (1988) Complement receptor type3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania* promastigotes. *J. Exp. Med.* **168**: 279.
- Sacks D.L. and Perkins P.V. (1984) Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sandflies. *Ann. J.Trop. Med.Hyg.* **34**: 456.
- Sacks D.L. and Perkins P.V. (1985). Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science.* **223**: 1417.
- Sacks D.L., Hieny S. and Sher A. (1985). Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J.Immunol.* **135**: 564.
- Sadick D.M., Locksley M.R., Tubbs C. and Raff V.H. (1986) Murine cutaneous leishmaniasis: resistance correlates with the capacity to generate interferon- γ in response to *Leishmania* antigens *in vitro* . *J.Immunol.* **136**: 655.
- Scholletins J. (1982) Lectin typing of *Leishmania* -strains from the New and Old World.In: Lectins-biology biochemistry. *Clinical Biochemistry.* ed. by T.C.Bog-Hansen, vol.II, Walter de Gruyter et co. Berlin/New York, P531.
- Scott P., Pearce E., Natovitz P. and Sher A. (1987) Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model I. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. *J.Immunol.* **139**: 221.
- Scott P., Pearce E., Natovitz P. and Sher A. (1987) Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. II. Immunologic properties of protective and non protective subfractions of a soluble promastigote extract. *J.Immunol.* **139**: 3118.
- Scott P., Natovitz P., Coffman R.L., Pearce E. and Sher A. (1988) Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J.Exp.Med.* **168**: 1675.

- Sheppard H.W., Scott P. and Dwyer D.M. (1983) Recognition of *Leishmania donovani* antigens by murine T lymphocyte lines and clones. Species cross-reactivity, functional correlates of cell-mediated immunity and antigen characterization. *J.Immunol.* **131**: 1446.
- Skov C.B. and Twohy D.W. (1974) Cellular immunity to *Leishmania donovani*: Evidence for synergy between thymocytes and lymph node cells in reconstitution of required resistance to *L. donovani* in mice. *J.Immunol.* **113**: 2012.
- Titus R.G., Kelso A. and Louis J.A. (1984) Intracellular destruction of *Leishmania tropica* by macrophages activated with macrophage activating factor/interferon. *Clin.Exp.Immunol.* **55**: 157.
- Titus R.G., Lima G.C., Engers H.D. and Louis J.A. (1984) Exacerbation of murine cutaneous leishmaniasis by adoptive transfer of parasite-specific helper T-cell populations capable of mediating *Leishmania major* -specific delayed-type hypersensitivity. *J.Immunol.* **133**: 1594.
- Titus R.G., Ceredig R., Cerottini J.C. and Louis J.A. (1985) Therapeutic effect of anti-L3T4⁺ monoclonal antibody GK1.5 on cutaneous leishmaniasis in genetically-susceptible BALB/c mice. *J.Immunol.* **135**: 2108.
- Titus R.G., Milon G., Marchal G., Vassalli P., Cerottini J.C. and Louis J.A. (1987) Involvement of specific Lyt-2⁺ T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.* **17**: 1429.
- Wright S.D., Reddy P.A., Jong M.T.C. and Erikson B.W. (1987) C3bi-receptor (complement receptor type3) recognizes a region of complement protein C3 containing the sequence Arg-Gly-Asp. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* **84**: 1965.
- Wyler D.J., Sypek J.P. and McDonald J.A. (1985) *In vitro* parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: Possible role of fibronectin in parasite attachment. *Infect.Immun.* **49**: 305.
- Wyler D.J., Beller D.I. and Sypek J.P.(1987) Macrophage activation for antileishmanial defense by an apparently novel mechanism. *J.Immunol.* **138** (4): 1246.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	4
PUBLICATIONS PERSONNELLES	13
RESUME	16
INTRODUCTION	18
GENERALITES	22
1- NOTIONS DE PARASITOLOGIE	23
1-1. Taxonomie	23
1-2. CYCLEEVOLUTIF	24
1-2-1. Cycle évolutif chez l'hôte intermédiaire	24
1-2-2. Cycle évolutif chez l'hôte définitif	28
2. LE DIAGNOSTIC DESLEISHMANIOSES	28
2-1. Le diagnostic des leishmanioses viscérales	28
2-2. Le diagnostic des leishmanioses cutanées	29
3. CULTURE DES LEISHMANIES	29
4. LES MODELES ANIMAUX UTILISES DANS LA LEISHMANIOSE	
EXPERIMENTALE	30
5. L'IMMUNITE DANS LA LEISHMANIOSE	31
5-1. La réponse immunitaire dans les leishmanioses humaines	32
5-1-1. L'immunologie des leishmanioses viscérales	32
5-1-2. L'immunologie des leishmanioses cutanées	32
5-2. La réponse immunitaire dans la leishmaniose expérimentale	33
5-2-1. Rôle du macrophage	33
5-2-2. Réponse humorale	35
5-2-3. Réponse immunitaire à médiation cellulaire	35
5-2-3-1. Existance de cellules T "protectrices"	36
5-2-3-2. Existance de cellules T "exacerbatrices"	37

5-2-3-3. Comparaison entre les cellules Th1, Th2 et Tp, Ts	38
5-2-4. Tentatives de vaccination expérimentale	39
6. LES ANTIGENES DE SURFACE DE <i>LEISHMANIA</i>	42
6-1. Analyse des antigènes de surface	42
6-2. L'antigène majeur de surface de <i>Leishmania</i> Gp65	43
6-2-1. Analyse biochimique de Gp65	43
6-2-2. Rôle de l'antigène majeur de surface Gp65 dans l'infectivité	45
6-2-3. Rôle de l'antigène majeur de surface Gp65 dans la protection	46
TRAVAUX PERSONNELS	48
ARTICLE1: Définition des conditions de culture nécessaire à la standardisation de la croissance des promastigotes de <i>Leishmania in vitro</i> .	49
ARTICLE 2 : Relation entre l'infectivité des promastigotes de <i>L. braziliensis</i> et l'augmentation de l'expression de l'antigène majeur de surface, la Gp65.	61
ARTICLE 3 : Corrélation entre le développement des formes métacycliques de <i>Leishmania</i> et l'augmentation de l'expression de l'antigène majeur de surface, Gp65.	70
ARTICLE 4 : Analyse de la réponse immunitaire suscitée chez la souris vis-à-vis de l'antigène majeur de surface, la Gp65, de promastigotes de <i>L. amazonensis</i> .	85
DISCUSSION	112
Références bibliographiques	121
Table des matieres	132

