

50376
1989
181

50376
1989
181

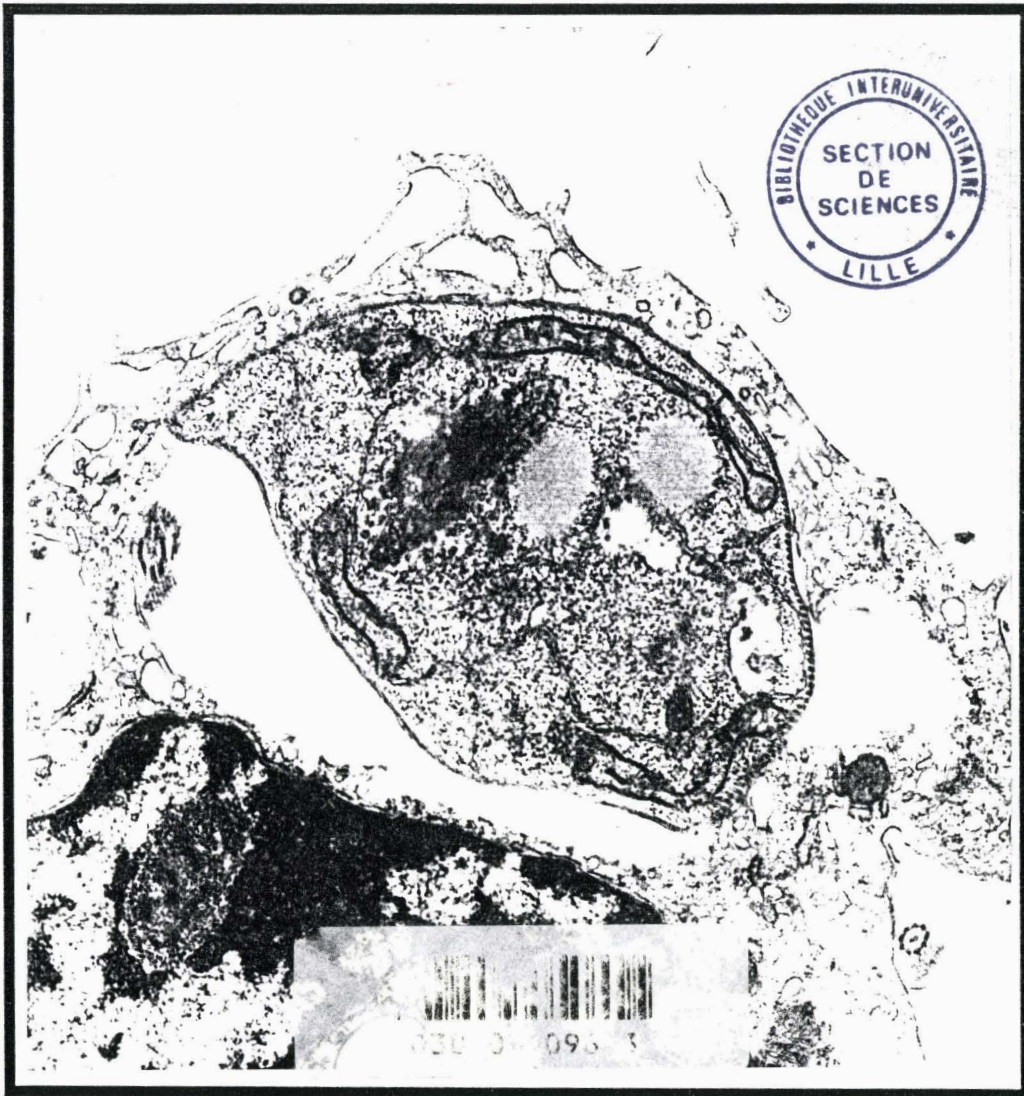
UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES-ARTOIS

Thèse présentée à l'Université de Lille I
pour obtenir le titre de Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

par

Farrukh S. RIZVI

**L'infectivité des promastigotes de
Leishmania est associée à l'expression
de leurs antigènes de surface**



Soutenue le 22 septembre 1989 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury	Président	: Professeur M. PORCHET
	Rapporteurs	: Professeur A. DHAINAUT
		: Docteur A. OUAISSI
	Examineurs	: Docteur M. RABINOVITCH
		: Professeur A. CAPRON

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire et sous la direction du

Professeur André CAPRON

Unité mixte INSERM 167-CNRS 624
Centre d'Immunologie at de Biologie Parasitaire
Institut Pasteur
1, rue du Pr. Calmette, 59019 Lille.

Avec la participation financière des organismes suivants:

1. INSERM
2. CNRS
3. Institut Pasteur de Lille
3. Foundation Rockefeller
4. CEE
5. PNUD/Banque Mondiale/OMS
6. CROUS de Lille
7. Fondation pour la Recherche Médicale.

**Je dédie cette Thèse : à mes Parents
à Kristin**

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur André CAPRON
de l'Académie des Sciences

Je suis très honoré de la confiance que vous m'avez témoignée en m'acceptant parmi vos élèves. C'est à vous que je dois ma formation en Immunologie Parasitaire. Votre dynamisme, l'étendue de votre savoir et de votre culture, votre goût pour la rigueur scientifique, font qu'il est passionnant d'être votre élève.

Puissé-je ne pas décevoir votre attentive sollicitude.

A Monsieur le Professeur M. PORCHET

Vous me faites aujourd'hui l'honneur de bien vouloir présider cette thèse. Qu'il me soit permis de vous exprimer ici ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur A. DHAINAUT

Vous avez toujours témoigné une bienveillante cordialité à mon égard. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez bien voulu apporter à ce travail et de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger cette thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde considération.

A Monsieur le Docteur M. RABINOVITCH

Je suis honoré de pouvoir bénéficier de votre compétence et vous suis particulièrement reconnaissant d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur M. A. OUAISSI

Pour avoir inspiré ce travail, m'avoir guidé dans l'élaboration et la réalisation de ce mémoire, avec patience et bienveillance, je tiens à vous témoigner ma sincère gratitude et mon respectueux attachement.

A Madame le Docteur M. CAPRON

A Madame le Docteur F. DARCY

Vous m'avez toujours montré une sympathie compréhensive. Veuillez accepter l'expression de ma très sincère admiration.

Je rends un hommage particulier à toutes celles et tous ceux grâce à qui ce travail fut mené à bien:

Daniel AFCHAIN

Pierre BILLAUT et Coll.

Jocelyne CORNETTE

Didier DESLEE

Marie-Pierre FOURMEAUX

Jean-Pierre KUSNIERZ

Mahmoud KWEIDER

Jean-Loup LEMESRE

Marie-Christine LIEBART

Marc LOYENS

Ferrucio SANTORO

Anne-Marie SCHACHT

André TARTAR et Coll.

Gérard TORPIER

Je tiens à leur exprimer ma très profonde reconnaissance.

Je n'oublierai certainement pas :

Fabienne AMEISEN

Claudine COLSON

Jacklyne DERICK

Christian DROLEZ

Jean-Michel GOUDERCOURT

Maria HOUZE

Sylvie-Anne LAFDAL

Marie-France MASSARD

Nadine VANTOUROUX

qui ont manifesté à mon égard une gentillesse peu commune et fait preuve d'une aide efficace. Je suis heureux de pouvoir leur témoigner ici ma reconnaissance et l'assurance de ma profonde estime.

Je remercie également Martine DAMONNEVILLE de la gentillesse et la patience avec lesquelles elle a accepté de relire et de corriger ce manuscrit. Qu'elle soit assurée de ma profonde estime.

Je ne saurais oublier Béatrice MARTY qui a assuré la bonne continuité du programme initial. Ses compétences scientifiques, son dynamisme et ses qualités humaines, ainsi que la confiance chaleureuse qu'elle m'a témoignée lors d'une partie de ce travail, ont été également pour moi un soutien permanent. Qu'elle soit assurée de toute ma gratitude et ma sincère amitié.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin et de quelque manière que ce soit, m'ont aidé à réaliser ce travail.

LISTE DES PUBLICATIONS

Les travaux présentés dans ce mémoire ont fait l'objet des publications suivantes:

1. LEMESRE, J. L., RIZVI, F. S., AFCHAIN, D., SADIGURSKY, M., CAPRON, A. & SANTORO, F. (1985). Subspecies-specific surface antigens of promastigotes of the *Leishmania donovani* complex. *Infect. Immun.*, **50** : 136-141.
2. RIZVI, F. S., AFCHAIN, D., SHERLOCK, I., SADIGURSKY, M., CAPRON, A. & SANTORO, F. (1985). Infectivity of *Leishmania* promastigotes is associated with surface antigenic expression. *Immunol. Lett.*, **11** : 317-323.
3. SANTORO, F., LEMESRE, J. L., RIZVI, F. S., AFCHAIN, D. & SADIGURSKY, M. (1986). Spécificité au niveau des protéines de surface des promastigotes de *Leishmania donovani*. (Laveran et Mesnil, 1903), *L. infantum* (Nicolle, 1908) et *L. chagasi*. (Cunha et Chagas, 1937). *Leishmania-Taxonomie et phylogénèse* (Coll. Int. CNRS/INSERM) IMEEE, Montpellier, pp 71-75.
4. SANTORO, F., LEMESRE, J. L., RIZVI, F. S., SADIGURSKY, M. & SHERLOCK, I. (1986). L'immunologie de la Leishmaniose viscérale: les antigènes de surface des promastigotes de *Leishmania chagasi* et leur rôle dans l'immunité. I.N.S.E.R.M. Actualités, p. 18-20.
5. SANTORO, F., KWEIDER, M., LEMESRE, J. L., DARCY, F. & RIZVI, F. S. (1986). Infectivity of *Leishmania* promastigotes is dependent on the expression of a 65 000 dalton surface antigen. In "Host-Parasite Cellular and Molecular Interactions in Protozoal Infections", K-P. Chang, ed., *Springer Verlag*, Heidelberg, **11**:117-122.
6. RIZVI, F.S., SHERLOCK, I., SADIGURSKY, M. and SANTORO. F. (1986). Monoclonal antibody differentiates between infective and non-infective promastigotes of *Leishmania chagasi*. *Immunobiology*, **173** : 251-252.

7. DARCY, F., TORPIER, G., KUSNIERZ, J. P., RIZVI, F.S. & SANTORO. F. (1987). *Leishmania chagasi* : *In vitro* differentiation of promastigotes monitored by flow cytometry. *Exp. Parasitol.*, **3** : 376-384.
8. RIZVI, F. S., OUAISSI, 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**:473-476.
9. LEMESRE, J. L., RIZVI, F. S., SANTORO, F., LOYENS, M., SADIGURSKY, M. & CAPRON. A. (1988). Autorégulation de la croissance *in vitro* des Trypanosomatidae. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **307**:283-288.
- 10.* GRANGETTE, C., GRUART, V., OUAISSI, M. A., RIZVI, F. S., DELESSESSE, G., CAPRON, A. & CAPRON, M.(1989). IgE receptor on human eosinophils (Fc_εRII): Comparison with B cell CD23 and association with an adhesion molecule. *J. Immunol.* in press.

* Cette publication n'a pas été incluse dans ce mémoire de thèse.

LISTE DES ABREVIATIONS

C3	:	Troisième composant du complément
C3b	:	Composant actif du C3
C3bi	:	Composant inactif du C3
CR1	:	Récepteur du C3b
CR3	:	Récepteur du C3bi
Fn	:	Fibronectine
GlcNAc	:	N-Acétyl-D-Glucosamine
gp63	:	Glycoprotéine membranaire de 63 kDa
IODOGEN	:	1, 3, 4, 6-tetrachloro-3 α , 6 α -dephenilglycoluril
kDa	:	Kilodalton
LCA	:	Agglutinine de <i>Lens culinaris</i>
LPG	:	Lipophosphoglycane
LPS	:	Lipopolysaccharide
MAC	:	Terminal membrane attack complex
MFR	:	Récepteur Mannose/Fucose
μm	:	Micromètre
P.M.	:	Poids moléculaire
PNA	:	Agglutinine de cacahuète
RGDS	:	Arg-Gly-Asp-Sér
SDS-PAGE	:	Gel de polyacrylamide en dodécyl sulfate de sodium

RESUME

RESUME

Les composants de surface des leishmanies interagissent avec le microenvironnement du parasite à différents stades de son développement, notamment au cours de la phase d'interaction entre le parasite et le macrophage. L'objectif de cette étude était d'identifier et de caractériser les molécules spécifiques de surface de *Leishmania chagasi* qui sont impliquées dans l'attachement du promastigote au macrophage.

En utilisant un modèle de culture *in vitro* standardisé en milieu acellulaire, nous avons pu montrer que la production de promastigotes infectieux dépend de la phase de croissance et semble restreint à la phase stationnaire. La technique de cytométrie de flux nous a également permis de suivre la différenciation des parasites *in vitro*. Des expériences parallèles ont montré une corrélation étroite entre l'évolution de l'intensité du "Forward scatter", les phases de croissance du parasite et leur pouvoir infectieux.

L'infectivité des promastigotes est associée à l'expression d'une glycoprotéine de surface de poids moléculaire 63 kDa (gp63) qui apparaît lorsque les parasites entrent en phase stationnaire et deviennent infectieux. De plus, nous avons démontré que la gp63 présente une communauté antigénique avec la fibronectine et exprime certaines de ses propriétés biologiques, notamment l'adhésivité. Nos résultats démontrent de façon indirecte l'existence d'une séquence Arg-Gly-Asp (RGD) dans la gp63. Nos expériences d'inhibition *in vitro* suggèrent que cette séquence peut se fixer aux récepteurs pour la fibronectine du macrophage lors de la phase d'adhésion du parasite à la cellule.

Par ailleurs, nos résultats démontrent qu'un facteur de croissance, thermostable, de poids moléculaire 70 kDa produit par les parasites semble jouer un rôle dans leur multiplication *in vitro* faisant intervenir un mécanisme de régulation négative.

En conclusion, nous avons décrit un nouveau mécanisme d'interaction de *Leishmania* avec la cellule hôte. Cette étude pourrait contribuer à une meilleure compréhension de la relation hôte-parasite et apporte quelques nouvelles données au concept de la mimique moléculaire.

Such as for their belly's sake,
Creep and intrude,
And climb into the fold.

William Wordsworth

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les maladies parasitaires représentent à l'échelle mondiale un problème majeur de santé publique tant par leur morbidité que par leur retentissement sur le potentiel de développement des pays du Tiers-Monde. Les initiatives de mise en valeur de ces contrées, notamment l'irrigation favorisant l'établissement de gîtes écologiques pour les vecteurs, retentissent de manière fâcheuse sur la fréquence de certaines parasitoses.

L'approche immunologique représente l'espoir essentiel de contrôle de ces maladies en raison de l'efficacité limitée des moyens de lutte contre les vecteurs. Les pesticides en général ne sont pas sans inconvénient sur les écosystèmes, sont onéreux, et entraînent d'angoissants problèmes de résistance. Les médicaments anti-parasitaires, certes efficaces à l'échelle individuelle, sont limités par leur coût. Le développement insuffisant des structures sanitaires de nombreux pays, s'ils stérilisent l'infection actuelle, ne peuvent prévenir la réinfection en zone endémique. De nombreux programmes internationaux ont été consacrés à l'approche vaccinale, sans qu'aucun vaccin anti-parasitaire ne puisse pour l'instant être utilisé chez l'homme malgré des outils technologiques très avancés pour la production d'antigènes parasitaires.

Cet échec tient certainement à la complexité des cycles biologiques des parasites, faisant intervenir souvent plusieurs hôtes successifs et requérant à chaque étape une adaptation, allant parfois jusqu'à une étroite spécificité pour une espèce déterminée d'invertébrés ou de vertébrés, ou même pour les organes atteints. Ceci est le cas de la Leishmaniose, maladie produite par un protozoaire, parasite intracellulaire de monocytes. Cette étonnante adaptation intracellulaire, dans une cellule dont l'une des fonctions est de combattre toute agression externe, assure la survie du parasite.

Le travestissement antigénique, qui procède selon les parasites de divers mécanismes, a pour effet de réduire l'efficacité de la réponse immunitaire en empêchant la reconnaissance ou l'accès des effecteurs immuns aux antigènes cibles. Dans de nombreux cas, le répertoire des antigènes exprimés à la membrane, cibles potentielles des mécanismes effecteurs de l'immunité, apparaît relativement limité. Les caractéristiques tenant à l'antigénicité propre du parasite, au niveau d'adaptation biologique, est illustré par un mécanisme de travestissement différent, celui de la mimiquerie moléculaire. Il apparaît à priori séduisant d'imaginer qu'un tel

mécanisme de mimiquerie puisse représenter une arme absolue de défense du parasite.

Le but de notre travail a été d'étudier les molécules de surface des promastigotes de *Leishmania* et leur participation dans les mécanismes d'attachement, de pénétration et de survie du parasite à l'intérieur des cellules hôtes afin de développer les moyens d'intervenir au niveau d'une ou plusieurs étapes de l'interaction *Leishmania*-cellule hôte.

There is nothing funny in the thought that even man, who was made in the image of God, bears about in his vital organs various forms of loathsome creatures, which riot on his fluids and consume the very substance of his tissues.

Philip Henry Gosse

GENERALITES

I. LEISHMANIES ET LEISHMANIOSES

Les leishmanioses fournissent l'un des meilleurs exemples de l'environnement épidémiologique. Mais, considérons d'abord que l'infection humaine n'est qu'un à-côté, un événement accidentel qui toutefois peut prendre une signification (ou un environnement) propre, comme jadis dans les désastreuses épidémies de Kala-Azar en Inde. Exactement comme pour la Fièvre jaune, le foyer naturel de la maladie sylvestre est relayé par un foyer non naturel centré sur l'homme. Je fais cette allusion pour souligner que l'écologie primaire est celle de la situation d'arrière-plan: les réservoirs animaux et les vecteurs Phlébotomes spéciaux. L'écologie secondaire toutefois peut être plus remarquable: l'homme représente lui-même le réservoir animal et des Phlébotomes endophiles sont les vecteurs.

1. DEFINITION

Les leishmanies sont des flagellés endocellulaires qui, par leur présence dans les cellules du système réticulo-histiocytaire de l'homme, déterminent les diverses leishmanioses. Bien que l'on connait classiquement deux ou trois espèces de leishmanies (*Leishmania donovani*, *Leishmania tropica* et *L. braziliensis*), la parfaite identité morphologique et biologique 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 (1885) Firth (1891) et Borowsky (1898) 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 & Comte, 1908) qui est souvent infesté dans certains pays.

2. REPARTITION GEOGRAPHIQUE ET IMPORTANCE

Répondues dans de vastes régions du globe (Figure 1) et aboutissant à des traductions cliniques très différentes, les leishmanies ont une importance médico-sociale très variable, allant de la peur inspirée pendant des siècles par le "kala-azar" au simple désagrément des cicatrices inesthétiques laissées par le bouton d'Orient. De nos jours, cependant, la différence est moins nette, le diagnostic des formes, viscérales et cutané-muqueuses, est transformé par l'acquisition des thérapeutiques modernes.

Le foyer méditerranéen englobe une notable portion du territoire français. Depuis les rives de la Mer Noire il couvre en effet tout le littoral méditerranéen. Alors qu'en Afrique du Nord les plus fréquentes sont les formes cutanées (clou de Biskra), ce sont surtout les viscérales qui sévissent en France.

C'est en 1918 que Labbe et ses collaborateurs publièrent le premier cas autochtone de leishmaniose viscérale, contracté sur la côte d'Azur, alors que le premier cas cutané, provenant du Roussillon, le fut en 1920 par Ravaut. Le foyer français comprend la Corse, la Côte d'Azur, la Provence, le Languedoc, le Roussillon et les Cévennes. Il est en continuité avec les foyers italien et espagnol.

Le foyer africain couvre tout le centre du continent du Soudan et du Kenya au Sénégal et au Congo. La maladie semble y être bien plus fréquente qu'on ne le pensait classiquement.

Le foyer indien englobe non seulement toute la péninsule indienne, mais également la Birmanie, Ceylan et la Thaïlande. La maladie est surtout à forme viscérale.

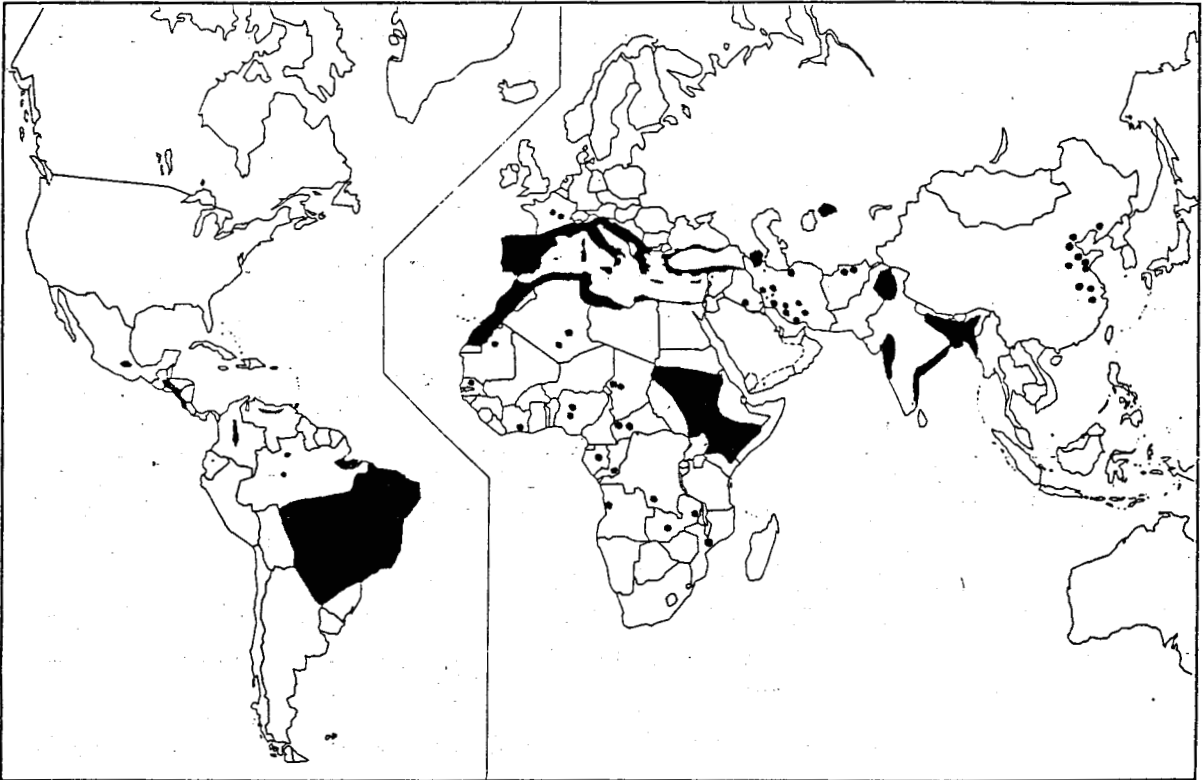
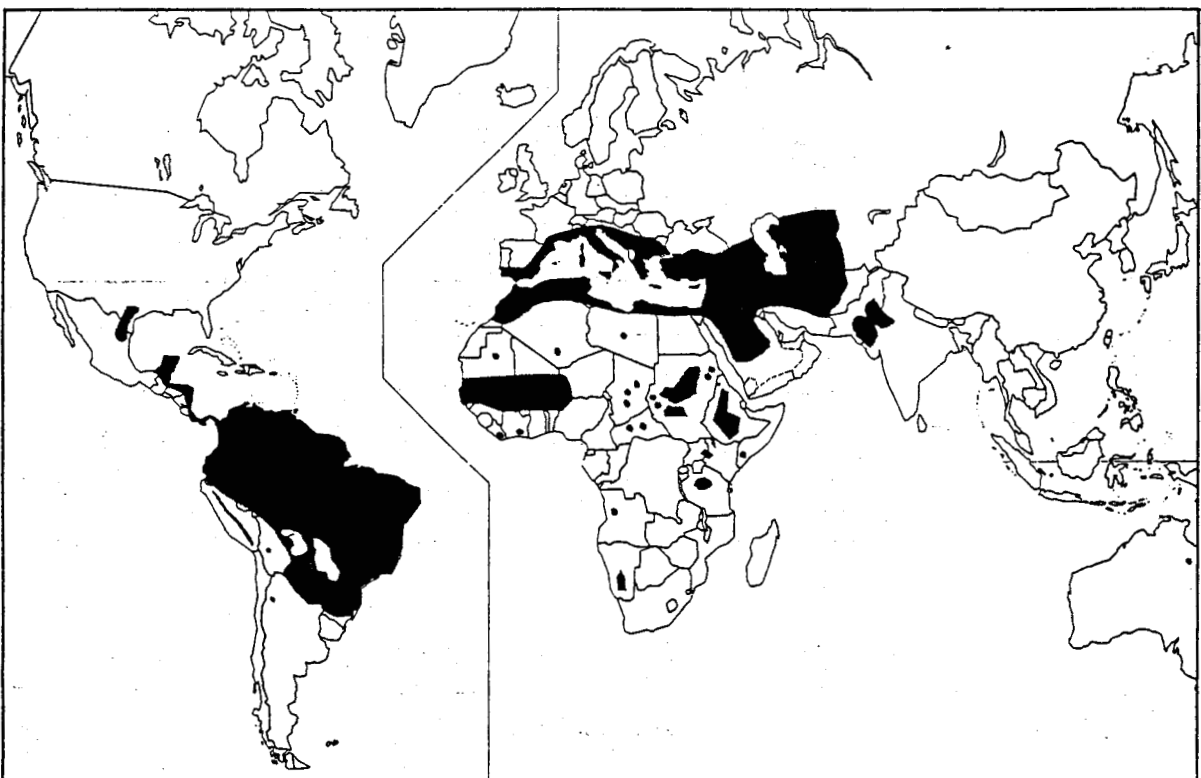
Le foyer centre-asiatique comporte l'Anatolie, le plateau irano-touranien et l'Asie centrale russe, foyers anciennement connus où les formes cutanées paraissent prédominer.

Le foyer chinois a une aire de répartition allant de la Mandchourie au Sud de Changai, mais les mouvements de troupes et de populations semblent avoir favorisé sa pénétration vers les régions plus méridionales. C'est la leishmaniose viscérale qui paraît y dominer.

Le foyer sud-américain est centré sur le Brésil, mais couvre pratiquement tout le continent jusqu'au Nord de l'Argentine. Notons qu'un premier cas vient d'être décrit en Guadeloupe. Pendant longtemps on a cru qu'il n'y avait dans cette partie du Monde que des formes cutanées ou cutané-muqueuses mais l'on s'aperçoit maintenant que les formes viscérales ne sont pas rares.

Figure 1: Distribution géographique des leishmanioses

■ Zones endémiques □ Zones sporadiques

Leishmaniose viscérale**Leishmanioses cutanée et cutanéomuqueuse**

3. MORPHOLOGIE

Seule la forme amastigote, sans flagelle libre, existe chez l'homme. C'est un élément arrondi ou ovalaire de 1,5 à 4 μm de diamètre, bien coloré par le Giemsa, avec un noyau sphérique et un kinétoplaste en bâtonnet transversal (ou ponctiforme) d'où part une courte racine flagellaire: le rhizoplaste.

4. BIOLOGIE DES LEISHMANIOSES

Les parasites vivent sélectivement dans les cellules du système réticulo-histiocytaire (S.R.H.): la peau, les muqueuses et les organes profonds (foie, rate, moëlle osseuse); ils s'y multiplient activement jusqu'à former des amas de 50 à 200 éléments qui font éclater la cellule hôte. Libérées, ces jeunes leishmanies sont bientôt phagocytées par de nouvelles cellules du S.R.H., fixes ou mobiles (monocytes), ce qui permet leur dissémination.

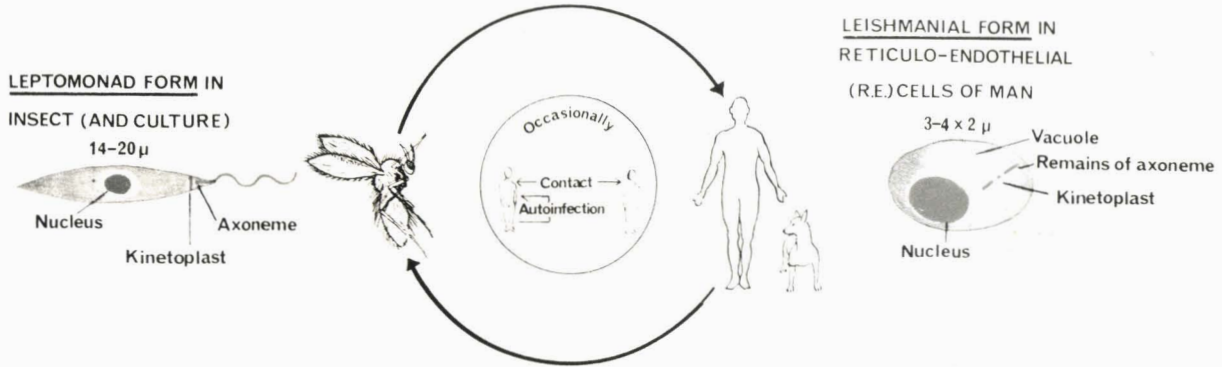
Le fait qu'une leishmanie se situe à la périphérie ou, au contraire, dans les organes profonds, obéit à des processus bien difficiles à cerner qui mettent en jeu certainement la souche, mais aussi le mode d'inoculation, la réponse individuelle du malade et d'autres facteurs non encore élucidés.

Le cycle évolutif (Figure 2) nécessite l'intervention, d'un hôte intermédiaire et vecteur: le phlébotome (Diptère : Psychodidé). Pompée par la femelle hématophage au cours d'un repas, la forme amastigote, arrivée dans le gastre, se transforme en promastigote, fuseau allongé, de 20 μm , avec un flagelle aussi long que le corps, se multiplie activement par division binaire. Une semaine plus tard, le phlébotome est dangereux, les promastigotes infectieux se sont accumulés dans son pharynx. Le cycle est bouclé quand, à l'occasion du repas de l'insecte sur un sujet neuf, les promastigotes, régurgités dans les téguments de ce dernier, sont immédiatement phagocytés par les cellules mononucléées au sein desquelles, devenus amastigotes, un nouveau cycle commence. En dehors de l'hôte définitif humain, le cycle est entretenu par un important réservoir animal, tant sauvage (rongeurs, canidés sauvages) que domestique (chien) qui varie selon les régions et les souches.

Leishmaniasis

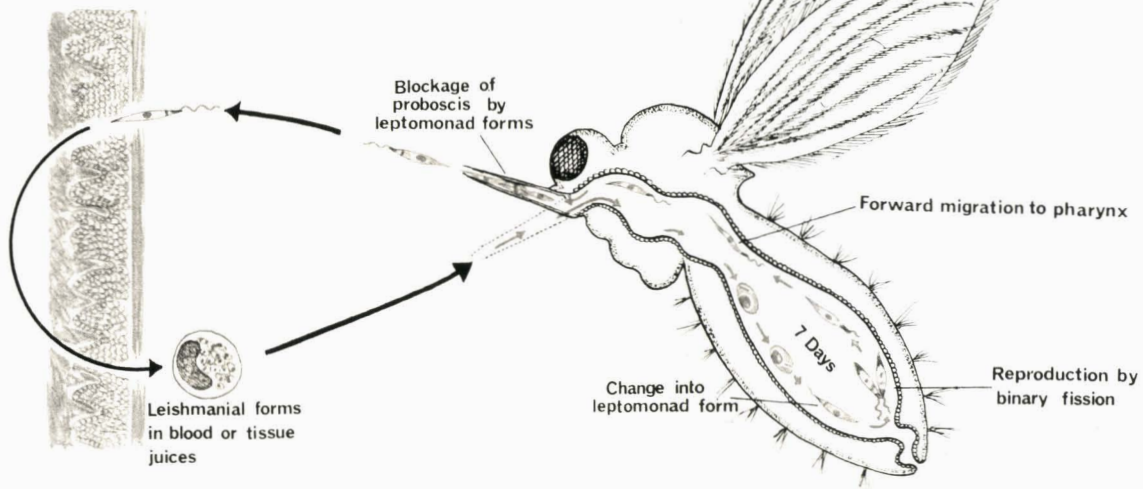
Species	<u>L. DONOVANI</u>	<u>L. TROPICA</u>	<u>L. BRAZILIENSIS</u>
Disease	VISCERAL (KALA AZAR)	CUTANEOUS (ORIENTAL SORE)	MUCO-CUTANEOUS (ESPUNDIA)

Life cycle and morphology of leishmania (SIMILAR IN ALL THREE SPECIES)



Cycle in insect

Spp. of *Phlebotomus* (SANDFLIES)



Cycle in man

Blocked Sandfly attempts to obtain blood meal. Injects leptomonad forms

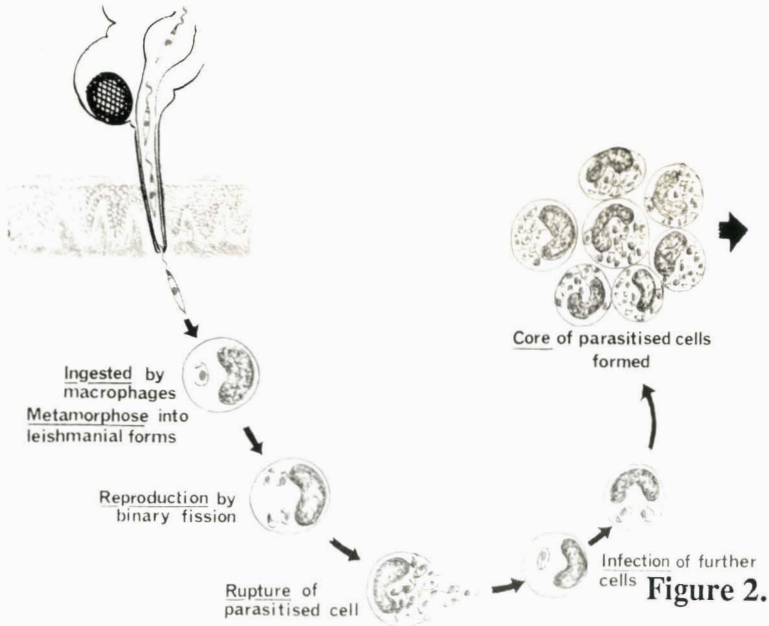
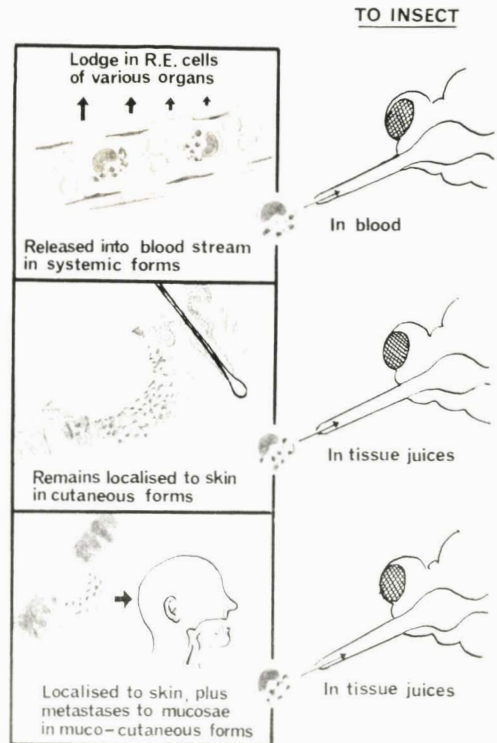


Figure 2.



5. MANIFESTATIONS CLINIQUES

Réticulo-endothéliose uniforme dans sa signification pathogénique profonde, l'atteinte leishmanienne se traduit, suivant la localisation préférentielle des parasites (cutanée, cutanéomuqueuse ou viscérale) (Tableau I, Figure 3) par des tableaux cliniques très différenciés et bien individualisés ce qui justifie le maintien d'une description séparée. Il est donc commode de conserver les dénominations classiques pour désigner leurs agents respectifs.

5.1. LEISHMANIOSE VISCERALE

La plus grave des leishmanioses humaines est une réticulo-endothéliose diffuse due à *Leishmania donovani*, son taux de mortalité avoisine 90 % en l'absence de traitement, elle constitue la plus grave des localisations leishmaniennes chez l'homme.

Encore désignée par son ancien nom (sanskrit) de "Kala-Azar", il existe: le Kala-Azar adulte ou Kala-Azar méditerranéen, dû à *L. d. infantum*.. Il s'agit en fait d'une seule et même maladie dont les manifestations chez l'adulte ou chez l'enfant ne varient que par leurs intensités relatives.

5.1.1 Kala-Azar indien

Le "kala-azar indien" , ainsi désigné car il semble bien originaire de ce pays où il est toujours fortement implanté, se rencontre également en Chine, dans le bassin méditerranéen et au Soudan, par foyers, en Amérique tropicale. En Inde, il semble bien que ce soit l'homme lui-même qui constitue, à l'heure actuelle, le réservoir de parasite. Des réservoirs animaux (chien surtout) interviennent dans les autres régions. La transmission est assurée principalement par *Phlebotomus argentipes*.

Après une incubation silencieuse de 1 à 4 mois, le début brutal est marqué par une fièvre irrégulière avec céphalées, par des vomissements et un rash miliaire.

La période d'état se constitue en quelques semaines avec la fièvre élevée, la splénomégalie progressive et l'anémie importante avec leucopénie.

Leishmanioses	Espèces ou complexes	Correspondances cliniques et Epidémiologiques
<p align="center">Leishmanioses de l'Ancien Monde</p>	<p><i>L. donovani infantum</i> <i>L. donovani donovani</i></p> <p><i>L. tropica minor</i> <i>L. tropica major</i> <i>L. aethiopica</i></p>	<p>Viscérale infantile du Bassin Méditerranéen Viscérale d'Inde, d'Afrique et de l'Est et de Chine (Kala-Azar)</p> <p>Cutanée sèche, Urbaine (Bouton d'Orient) Cutanée Humide, Rurale Cutanée localisée ou diffuse</p>
<p align="center">Leishmanioses du Nouveau Monde</p>	<p><i>L. donovani chagasi</i></p> <p>Complexe <i>L. mexicana</i> <i>L. mexicana mexicana</i> <i>L. mexicana amazonensis</i> <i>L. mexicana pifanoi</i></p> <p>Complexe <i>L. braziliensis</i> <i>L. braziliensis braziliensis</i> <i>L. braziliensis guyanensis</i> <i>L. braziliensis panamensis</i> <i>L. braziliensis peruviana</i></p>	<p>Viscérale de l'Amérique Latine</p> <p>Cutanée localisée, l'Ulère des Chicleros Cutanée localisée ou diffuse Lépromateuse diffuse</p> <p>Cutanéo-muqueuse, l'Espundia Cutanée ulcérate, La Buba Cutanée ulcérate, Le Pian-bois Cutanée bénigne, la Uta du Peru</p>

TABLEAU I : CLASSIFICATION ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES LEISHMANIOSES

Figure 3: MANIFESTATIONS CLINIQUES DES LEISHMANIOSES**Leishmaniose Viscérale**

- A : Viscérale d'Inde, d'Afrique et de Chine (Kala-Azar indien)
- B : Viscérale infantile du Bassin Méditerranéen
- C : Lésions Post Kala-Azar

Leishmanioses Cutanée et Cutanéomuqueuse

- E : Cutanée sèche, Urbaine (Bouton d'Orient)
- F : Cutanée humide, Rurale
- G : Cutanéomuqueuse (Espundia)
- H : Cutanéomuqueuse destructive
- I : Cutanée diffuse
- J : Cutanée diffuse, Lépromateuse



Figure 3.

Le tableau se complète parfois d'une hépatosplénomégalie et de signes cutanés :

- pigmentation bistre ("maladie noire") avec plages dépigmentées ;
- discrètes, mais caractéristiques, plaques chamoisées jaunâtres et, tardivement, leishmanides lenticulaires de la face et du tronc.

L'examen de la formule sanguine révèle une anémie et une granulopénie; à l'électrophorèse, une inversion du rapport albumine/globuline. L'état général se dégrade très vite et l'évolution se fait vers la cachexie, les complications intercurrentes, infectieuses, hémorragiques ou cirrhotiques, aboutissent à la mort en quelques mois.

5.1.2. Kala-Azar Infantile

Le "Kala-Azar infantile" se distingue du précédent par sa prédilection pour l'enfant, sa répartition péri-méditerranéenne ("Leishmaniose splénique infantile méditerranéenne") et par son apparition sporadique au départ d'un réservoir de parasite canin. Rappelons que vingt cas en moyenne sont diagnostiqués chaque année dans le sud de la France.

Cliniquement, l'évolution est plus rapide (quelques semaines) et se marque par une splénomégalie souvent monstrueuse, dépassant presque toujours l'ombilic et arrivant même à masquer le pôle inférieur derrière l'arcade pubienne.

5.2. LEISHMANIOSES CUTANÉES

Pratiquement confinées dans l'Ancien Monde, elles sont dues à *L. tropica*. Leur caractère essentiel est de rester parfaitement localisées au point d'inoculation, les leishmanies se développant *in situ*.

5.2.1. Forme sèche ou "Bouton d'Orient"

Cette maladie, due à *L. tropica minor*, est celle des agglomérations des zones désertiques et pré-désertiques de l'Afrique du Nord aussi bien que celles du Moyen-Orient, du Nord et du Centre de l'Inde, de l'Asie centrale et même, pour quelques foyers, de l'Europe méditerranéenne. Cette forme "urbaine", toujours bénigne, passe surtout d'homme à homme,

transmise principalement par *Phlebotomus papatasi*, mais il est à peu près certain que le chien, souvent infecté, doit servir parfois de réservoir de parasite.

Après une incubation muette très longue (plusieurs mois parfois), la lésion débute, au point d'inoculation, par une petite macule rouge sombre qui évolue lentement vers le bouton caractéristique: nodule dur, infiltré, mobile sur les plans profonds, recouvert d'une peau lie-de-vin, se desquamant en écailles, et dont le centre est occupé par une croûte épaisse et très adhérente; cette croûte, arrachée, révèle les fins dendrites de sa face inférieure, quasi pathognomoniques (signe de la herse de Montpellier) et une petite ulcération à fond tourmenté et bords taillés à pic où fourmillent les leishmanies.

L'évolution se fait en plusieurs mois ("bouton d'un an") vers la guérison spontanée qui, au prix d'une cicatrice indélébile et inesthétique, confère une immunité durable mais homologue.

5.2.2 Forme humide, "Leishmaniose Cutanée" Zoonotique de l'Asie Centrale.

Due à *L. tropica major*, cette maladie est, au contraire, rurale et sévit surtout dans les steppes désertiques de l'Asie centrale; elle est transmise par *Phlebotomus caucasicus* qui vit dans les terriers des rongeurs sauvages réservoirs du parasite (*Rhombomys opimus*).

Affection d'évolution rapide, elle se caractérise, après une incubation muette de 4 semaines au plus, par une ulcération large (2 à 8 cm de diamètre) à fond bourgeonnant, papillomateux, recouvert d'un enduit plus ou moins purulent, et à bords éversés pauvres en leishmanies; souvent surinfectée et s'accompagnant alors de lymphangite et d'adénopathie satellite, elle évolue en six mois au plus vers la guérison avec cicatrice importante et inesthétique.

5.3. LEISHMANIOSES CUTANEO-MUQUEUSES

Leur terre d'élection est l'Amérique tropicale; elles sont dues à *Leishmania braziliensis*, conservée le plus souvent par un réservoir animal, sauvage et sylvaïque, et transmise par *Phlebotomus intermedius*.

Très polymorphes, elles ont en commun la tendance des lésions cutanées initiales à s'étendre (dans 10 à 20 % des cas) aux muqueuses soit par contiguïté, soit par métastases. Cinq types cliniques principaux, rapportés à tort ou à raison à des agents différents, sont classiquement individualisés de nos jours :

- L'"Espundia" (dû à *L. br. braziliensis*) est la forme chronique très mutilante des forêts pluvieuses du Brésil; la lésion cutanée primitive se présente comme une forme humide grave de bouton d'Orient qui évolue de façon torpide en 1 à 3 ans vers la guérison, laissant une cicatrice indélébile. Par contre, les lésions muqueuses secondaires métastatiques qui atteignent le rhino-pharynx dans 85 % des cas, ont un caractère de haute gravité et un pronostic beaucoup plus sévère du fait des destructions progressives qu'elles entraînent: cloison nasale, paroi des fosses nasales, voile du palais, carrefour aéro-digestif. Il n'y a pas, pour ces formes, de guérison spontanée et la surinfection est la règle.
- La "Uta" du Pérou (due à *L. br. peruviana*) est une forme cutanée bénigne dont les multiples petites lésions ont un caractère peu destructeur.
- La "Buba" ou "Plan-bois" de Panama et des Guyanes (due à *L. br. guyanensis*) se matérialise par une lésion unique, ulcérate, torpide et extensive, guérissant spontanément en 2 à 3 ans ; la lésion primitive ne donne pas de métastases, mais, à la face, peut, dans 5 % des cas, atteindre par contiguïté la muqueuse nasale, entraînant alors des destructions considérables.
- L'"ulcère des chicleros" (dû à *L. m. mexicana*) frappe, au Guatemala et au Mexique, les travailleurs de la forêt; ce serait une affection bénigne si elle n'avait pas une prédilection particulière pour le pavillon de l'oreille où elle donne une lésion nodulaire, ulcérate, désespérément chronique et très mutilante.
- La "Leishmaniose lépromateuse diffuse", signalée par endroit, réalise un tableau de lésions cutanées multiples d'aspect lépromateux, disséminées sur tout le corps mais n'intéressant pas les muqueuses; on l'attribuait autrefois à *L. mexicana pifanoi*, mais certains pensent qu'il s'agit simplement de *L. braziliensis* évoluant sur un terrain anergique.

II. RELATIONS HOTE-PARASITE

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude des relations hôte-parasite. Je me limiterai dans ce chapitre à décrire brièvement ceux qui concernent les phénomènes de reconnaissance entre le parasite et la cellule de l'hôte. Je discuterai des travaux concernant les récepteurs et les ligands intervenant plus particulièrement les molécules de la surface des parasites.

1. ATTACHEMENT DANS L'INSECTE VECTEUR

Des études en microscopie électronique ont démontré que le promastigote de *Leishmania* se lie aux microvillis par l'interdigitation du flagelle (Killick-Kendrick *et al.*, 1974) ou par la modification du flagelle et la formation d'une plaque d'hémidesmose (Molyneux *et al.*, 1975). Ce phénomène a beaucoup d'importance puisqu'il maintient les promastigotes dans le tube digestif au cours des différents stades de développement du parasite. Le mécanisme précis à un niveau moléculaire par lequel s'opère ce processus d'attachement n'est pas encore connu, de même que les moyens par lesquels les promastigotes se détachent pour pouvoir migrer vers le probosis. Il semblerait que des interactions de types lectine-protéine jouent un rôle important dans ce phénomène et les saccharides présents dans le repas sanguin pourraient intervenir dans le détachement du parasite.

2. ATTACHEMENT ET PENETRATION DU PARASITE DANS LES PHAGOCYTES MONONUCLEES.

Bien que l'attachement du promastigote (Aikawa *et al.*, 1982) et de l'amastigote (Wyler, 1982) soit inhibé par la cytochalasine, la phagocytose de ces deux stades est décrite par Silversteen (1977) comme une fermeture éclair (Zipper hypothesis) faisant intervenir une interaction séquentielle de plusieurs molécules présentes à la surface des cellules avec celles du promastigote. Ce mécanisme est assuré par l'actine et la myosine qui réagissent au point de contact entre le parasite et la cellule hôte. Après avoir franchi cette barrière, les parasites entraînent une fusion entre le phagosome et le lysosome secondaire (Alexander & Vickerman,

1975; Chang & Dwyer, 1976). Le parasite survit et se multiplie à l'intérieur de ces phago-lysosomes.

L'identification des ligands et des récepteurs impliqués dans la phase d'attachement du parasite à la cellule fait l'objet de nombreux travaux durant ces deux dernières années. Il est difficile de déterminer quelle molécule à la surface du parasite et de la cellule peut être considérée comme ligand ou comme récepteur. Dans le cas de *Leishmania* le parasite survit et se multiplie dans les cellules qui tuent tout d'autre organismes. L'un des évènements importants qui se traduit par l'activité respiratoire de macrophage est la production de métabolites toxiques de l'oxygène. Certaines interactions du récepteur-ligand jouent un rôle dans ces évènements (Berton & Gordon, 1983)) mais d'autres non (Wright & Silverstein, 1983; Yamamoto & Johnston, 1984). L'ensemble de ces processus assurent une activité anti-bactérienne (Locksley & Klebanoff, 1983). Les promastigotes et les amastigotes de *Leishmania* déclenchent l'explosion respiratoire ("Respiratory burst") avec une intensité variable (Murray, 1981, 1982; Channon *et al.*, 1984). En absence de sérum, les promastigotes induisent une explosion respiratoire aussi forte que celle induite par le zymosan extrait de membranes des levures (Murray, 1981). En revanche, les amastigotes dans les même conditions sont moins efficaces. Blackwell (1985) pense que ces deux formes de parasite utilisent deux types de récepteur du macrophage pour y pénétrer. Channon *et al.* (1984) ont décrit qu'une partie des amastigotes attachées au récepteur déclanche l'explosion respiratoire. En effet, une phosphatase acide résistante au tartrate isolée à partir de membrane de *L. donovani*, inhibe la production d'anions superoxydes par les neutrophiles humains (Ramaley *et al.*, 1984). Par ailleurs les études en microscopie électronique ont démontré la présence d'une phosphatase acide à la surface des amastigotes et des promastigotes (Gottlieb & Dwyer, 1981; Dwyer & Gottlieb, 1983) mais aucune étude quantitative n'a été faite aux deux stades du parasite.

3. ROLE DU RECEPTEUR MANNOSE/FUCOSE

Parmi les récepteurs du macrophage qui sont bien caractérisés, les récepteurs du complément et du mannose-fucose ou "Lectin-like" qui se lie spécifiquement aux ligands portant des résidus L-fucose, D-mannose, D-glucose et N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) ont

reçu une attention particulière (Stahl *et al.*, 1978; Shepherd *et al.*, 1981). En utilisant diverses lectines, Dwyer (1977) a démontré la présence de ligands portant des structures glycaniques de types D-mannose, L-fucose et GlcNAc dans la membrane du parasite. Récemment l'existence de glycoconjugués riches en mannose a été démontrée à la surface du promastigote des leishmanies (Dwyer & Gottlieb, 1983; Turco *et al.*, 1984). C'est un ligand important qui peut utiliser le récepteur mannose-fucose (MFR) des cellules hôtes. Wilson & Pearson (1986) ont démontré que *L. donovani* utilise le MFR à la surface des monocytes humains. Ils ont aussi démontré que l'attachement du promastigote est inhibé de manière significative par les ligands polyvalents comme le mannane, le mannose-BSA et le fucose-BSA par rapport aux ligands monovalents comme les monosaccharides. De nombreux laboratoires ont confirmé ces travaux.

4. ATTACHEMENT VIA LE RECEPTEUR DU COMPLEMENT

Le récepteur du complément de type III (CR3) du macrophage semble jouer un rôle important dans l'attachement et la phagocytose des particules du zymosan. Ce récepteur reconnaît spécifiquement le produit de clivage C3bi du complément C3. Le C3bi peut intervenir dans l'opsonisation de particules de zymosan. L'attachement de ces dernières recouvertes de C3bi peut être inhibé par un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur CR3. Ezekowitz *et al.*, (1984) ont également observé l'attachement du promastigote au récepteur du complément type III (CR3). Ces travaux ont attiré l'attention de Blackwell *et al.* (1985b) qui ont étudié le rôle du complément et le récepteur CR3 dans l'interaction de *Leishmania* avec leurs cellules hôtes. Dans les expériences décrites par J. Blackwell, trois réactifs ont été utilisés: un anticorps monoclonal (M1/70) qui se fixe spécifiquement au récepteur CR3 (Beller *et al.*, 1982), des fragments Fab d'anticorps anti-C3 humain qui réagit de façon croisée avec le C3 de souris (Micklem *et al.*, 1984) et un inhibiteur d'une liaison covalente de C3 sur une surface (Sim *et al.*, 1981). Ces trois réactifs ont pu inhiber 80% d'attachement du promastigote à la surface des macrophages péritonéaux de souris. Par contre, moins de 40% d'attachement d'amastigote a été inhibé. Ceci montre que seulement les promastigotes sont capables d'activer le complément.

Les expériences citées précédemment montrent que le CR3 peut jouer un rôle dans l'adhérence des promastigotes aux macrophages en présence ou absence de sérum (Blackwell, *et al.*, 1985; Wozencraft *et al.*, 1986). Cependant la situation *in vivo* semble être très compliquée parce que les promastigotes peuvent être lysés en présence de sérum non-immun si le complément est activé par la voie alterne ou classique (Pearson & Steigbigel, 1980; Mosser & Edelson, 1984). Il n'est pas évident que l'activation du complément puisse être avantageuse pour le parasite. L'étude menée par Franke *et al.* (1985) montre la survie différentielle, dans le sérum humain normal, des parasites provenant de culture en phase logarithmique et stationnaire. Les parasites en phase stationnaire sont plus résistants à la lyse par le complément. Aucune comparaison n'a pas été faite en ce qui concerne la capacité de fixation du C3 de ces deux populations du parasite. Wozencraft & Blackwell (1987) ont montré une corrélation entre l'infectivité de *L. donovani* vis-à-vis des macrophages péritonéaux *in vitro* et la capacité de fixation de C3 à la surface des formes promastigotes de ce parasite. Ces résultats ont été également confirmés *in vivo*. Ils sont intéressants parce que les cellules "Küpferr" du foie de souris n'expriment pas le CR3 (Flotte *et al.*, 1982). Les promastigotes de phase stationnaire doivent stimuler l'afflux de monocytes qui expriment le CR3 au site d'infection *in vivo*, probablement par chimiotactisme et changement vasculaire associés avec relargage de C3a et C5a suite à l'activation du complément par la voie alterne. Cependant le dépôt du C3b peut conduire à la formation du complexe lytique C3b-a (Terminal membrane attack complex, MAC). Les promastigotes résistants devraient avoir un moyen d'échappement pour la formation de ce complexe. Certains polysaccharides peuvent inhiber la formation du MAC chez les bactéries (Joiner *et al.*, 1986a), alors que les protozoaires, *Trypanosoma brucei* et *T. cruzi* peuvent avoir les antigènes de surface qui inhibent la fixation de C3b au composant d'amplification, le facteur B (Joiner *et al.*, 1986b; Devine *et al.*, 1986). La modification d'antigènes de surface liés à l'infectivité des promastigotes peut être l'un des éléments dans ce mécanisme. Aucune des données sur les amastigotes n'est disponible pour l'instant. Il est probable que le mécanisme de résistance contre la lyse induite par le complément est différent chez l'amastigote. Par ailleurs, certaines observations récentes montrent que le CR3 non seulement facilite l'attachement de promastigote mais également permet la survie du parasite à l'intérieur du macrophage (Mosser & Edelson, 1987).

De nombreux auteurs ont étudié les molécules parasitaires portant ou exprimant les récepteurs pour le complément et ses produits de clivage. Russell (1987) a identifié la glycoprotéine de poids moléculaire (p.m.) 63 kDa à la surface des promastigotes de *L. mexicana* qui joue un rôle de site accepteur du C3.

Très récemment le rôle d'un second récepteur du complément (CR1) dans l'attachement des promastigotes aux macrophages a été démontré (da Silva *et al.*, 1988). Les auteurs montrent que l'attachement des promastigotes non-infectants se fait par le biais du récepteur CR3, en revanche, les promastigotes infectants utilisent préalablement le récepteur CR1. En effet, l'attachement des promastigotes de la phase de croissance logarithmique peut être inhibé par un anticorps monoclonal OKM1 qui se fixe au site du CR3 qui a une propriété de lectine, mais ne peut pas être inhibé par un autre anticorps OKM10 qui est dirigé contre le site du CR3 qui se fixe au C3bi (Wright *et al.*, 1983).

5. COOPERATION ENTRE LE MFR ET LE CR3 DANS L'ATTACHEMENT DU PROMASTIGOTE.

Les travaux de Blackwell (1985) suggèrent que les inhibiteurs du MFR et du CR3 bloquent l'attachement du parasite au macrophage et ceci de manière équivalente. L'inhibition simultanée du MFR et CR3 n'a pas abouti à une plus forte diminution de l'adhérence des promastigotes aux macrophages (Blackwell *et al.*, 1985b). Ces travaux sont en contradiction avec ceux effectués par Ezekowitz *et al.* (1983) où l'addition du mannane et l'anticorps M1/70 a produit un effet synergistique négatif sur la phagocytose du zymosan. Ceci dépend de l'expression des deux récepteurs sur les macrophages. Cependant, le mannane n'inhibe pas l'activation de la voie alterne induite par le parasite. L'effet inhibiteur du mannane n'est modulé par l'attachement médié par le CR3. Il apparaît que le MFR et le CR3 jouent un rôle équivalent mais indépendant.

Il a été aussi démontré que le CR3 participe à l'adhérence des hématies cotées par le C3bi aux macrophages, mais ceci n'induit pas leur phagocytose (Griffin & Griffin, 1980). Blackwell a fait toute une série d'expériences pour pouvoir répondre à cette question. La déplétion sélective de ces récepteurs n'a pas empêché l'attachement du parasite. De plus, les inhibiteurs solubles de ces récepteurs présents en même temps n'ont pas pu complètement

inhibé l'attachement des promastigotes aux macrophages. Quoique la base moléculaire d'action coopérative de ces récepteurs n'est pas encore connue, de nombreux auteurs pensent que ces deux récepteurs ont une action simultanée importante dans l'attachement et la phagocytose du promastigote. Le déclenchement des signaux biologiques par l'aggrégation du complexe récepteur/ligand a été décrit dans d'autres systèmes (Ishizaka, 1982; Young *et al.*, 1983) sauf dans le système MFR/CR3.

6. INTERACTION DES PROMASTIGOTES AVEC LES CELLULES HOTES

Plusieurs laboratoires ont consacré leurs travaux à l'interaction des promastigotes avec les macrophages afin de développer un modèle *in vitro* et *in vivo*. Ces laboratoires ont utilisé les macrophages récupérés à partir d'animaux qui ne sont pas des hôtes naturels des diverses espèces de leishmanies pour élaborer un modèle *in vitro* (Handman & Spira, 1969; Miller & Twohy, 1969; Bray, 1974; Alexander & Vickerman, 1975; Chang & Dwyer, 1976). Les cellules tumorales ont également été utilisées dans certains laboratoires (Frothingham & Lehtimaki, 1969; Lewis, 1974; Mattock & Peters, 1975). Du fait que les promastigotes peuvent avoir une spécificité vis-a-vis d'hôte, on a également étudié l'interaction du parasite avec les cellules provenant de l'hôte naturel tel que l'homme. Il a en effet été démontré que les amastigotes de *L. entriiti* ne sont pas tués par des macrophages de cobaye mais dans des mêmes conditions les parasites sont tués par les macrophages de souris.

Les macrophages péritonéaux de souris, rats ou hamsters et le sarcome du chien (Lamy *et al.*, 1964) sont utilisés comme des cellules hôtes pour un grand nombre d'espèces de *Leishmania* afin d'étudier la différenciation cellulaire (Chang & Fish, 1983). Ces études ont été limitées par le fait que les cellules péritonéales en culture ont une durée de vie limitée; de plus le sarcome du chien n'a qu'une faible activité phagocytaire (Frothingham & Lehtimaki, 1969). Finalement, les lignées macrophagiques tumorales (P388D1 et J774) ont été choisies comme un modèle assez satisfaisant (Berens & Marr, 1979). Aujourd'hui on utilise ces deux lignées avec beaucoup de succès pratiquement pour toutes les espèces de leishmanies. Malgré ce développement de modèles *in vitro*, on a connu certains nombres de difficultés en ce qui concerne la reproductibilité du système, liées au fait que les parasites utilisés pour ces cellules provenaient le plus souvent de cultures en pleine phase de croissance logarithmique. Mais la

biologie des leishmanies est encore très peu connue. Il a été également décrit que les promastigotes subissent une différenciation au cours de leur maturation chez l'insecte vecteur. Cependant, les études morphologiques sur différentes formes de promastigotes n'ont révélé aucune différence (Killick-Kendrick & Molyneux, 1974). Les travaux de Giannini *et al.* (1974) ont montré une corrélation entre l'infectivité de promastigotes vis-à-vis des animaux expérimentaux et leur cycle du développement chez l'insecte vecteur. Ces travaux n'ont pas été pris au sérieux puisque les promastigotes en culture sont considérés comme une population homogène. Sacks & Perkins (1984) ont démontré que les promastigotes provenant de culture en phase stationnaire sont plus infectieux que ceux de la phase logarithmique. Les promastigotes obtenus de la phase stationnaire de la culture ne peuvent pas être agglutinés par la lectine extraite de la cacahuète (dénommés promastigote PNA⁻). Ces expériences ont été faites avec les promastigotes de *L. tropica* aussi bien *in vitro* que *in vivo*. (Sacks & Perkins, 1984, 1985). De plus, ces auteurs ont utilisé le critère de PNA⁻ pour pouvoir caractériser les promastigotes infectieux et non-infectieux. Puisque les promastigotes de l'insecte vecteur après sept jours sont toujours infectieux, on a pu constater que les promastigotes en phase stationnaire ressemblent à ceux du vecteur au point de vue de leur pouvoir pathogène; l'infectivité des promastigotes de *Leishmania* est donc dépendante du cycle de multiplication *in vitro* et *in vivo*.

7. LA FIBRONECTINE ET SON ROLE DANS L'INTERACTION HOTE-PARASITE

Les fibronectines (Fn) constituent une classe de glycoprotéines de haut poids moléculaire présentes sous forme soluble dans le plasma et certains liquides biologiques, et sous forme insoluble dans les tissus (Mosesson & Amrani, 1980; Pearlstein *et al.*, 1980; Rouslahti, 1981). La molécule est composée de deux sous-unités dont le poids moléculaire est compris entre 220 et 250 kDa. Elles sont reliées par deux ponts disulfures situés à l'extrémité C-terminale des chaînes. De nombreux types cellulaires, mis en culture, sont capables de synthétiser la Fn. De plus les macrophages et les fibroblastes possèdent le récepteur pour la Fn et expriment la molécule à leur surface. La Fn se fixe également aux bactéries, aux glycoprotéines virales, à certains protozoaires parasites et interagit avec des composants du

système complément. Comme conséquence de ces interactions multiples, on soupçonne que les fibronectines pourraient jouer un rôle de glycoprotéines opsonisantes. Elles sont impliquées dans l'expression de divers fonctions cellulaires, notamment la migration et l'adhésion cellulaire (Pierschbacher & Hayman, 1983; Pierschbacher & Rouslahti, 1984). La molécule de Fn se fixe aux surfaces cellulaires par un site spécifique d'attachement cellulaire distant des autres sites présents sur la molécule. L'utilisation de peptides synthétiques a permis d'identifier de façon plus précise la partie de la molécule de fibronectine qui se fixe aux surfaces cellulaires (Pierschbacher & Hayman, 1983). Plus récemment, il a été démontré que cette région de la molécule contient un térapeptide arginine-glycine-acide aspartique-sérine (RGDS) qui constitue le site de fixation (Pierschbacher & Rouslahti, 1984).

7.1. Interactions Moléculaires de la Fibronectine

7.1.1. Les composants du système du complément

Certains travaux récents (Hautanen & Keski-Oja, 1983; Kono *et al.*, 1983) ont montré que le C1q, le C3 et ses fragments de clivage se lient à la fibronectine. Il a été également observé que la Fn exerce un effet amplificateur sur la phagocytose de particules activatrices de la voie alterne du complément par les monocytes humains. Cette propriété semble liée à certains fragments de clivage de la molécule de fibronectine (Czop *et al.*, 1981).

7.1.2. Les surfaces bactériennes, virales et parasitaires

Divers travaux ont montré que la Fn se fixe aux staphylocoques et streptocoques. Cette fixation se fait par le biais d'un fragment de 27 kDa situé à la partie N-terminale de la molécule de fibronectine (Mosher, 1980). Certains auteurs suggèrent qu'elle pourrait jouer un rôle dans la phagocytose des bactéries par les macrophages; d'autres pensent que la fixation des bactéries aux tissus par le biais de la Fn pourrait être un élément favorable au développement de colonies bactériennes (Mosher & Proctor, 1980).

L'interaction de la Fn avec des surfaces parasitaires a été décrite. De façon générale, les extraits antigéniques somatiques des parasites ayant une localisation tissulaire ou sanguine,

contiennent des molécules ayant des déterminants antigéniques identiques à ceux de la Fn (Ouaissi *et al.*, 1983). De même il a été démontré que l'antigène B de cysticerques de *Tænia solium* a des propriétés identiques à celles de la Fn (Plancarte *et al.*, 1983). Ces molécules peuvent être également présentes à la surface des parasites où elles sont intimement liées à leur membrane (Ouaissi *et al.*, 1984). Des observations analogues ont été rapportées dans le cas d'un flagellé, *Trichomonas tenax* (Ribaux *et al.*, 1983). Deux hypothèses peuvent être avancées: la première serait l'incorporation de la Fn de l'hôte par le parasite; la seconde, une synthèse, par le parasite, de composants ayant une structure antigénique similaire à celle de la Fn. La séquence RGDS a été trouvée dans des protéines de plusieurs organismes primitifs. Les récepteurs de *E. coli*, la protéine lambda B, la protéine du virus de Sindbis, contiennent une séquence RGDS mais ne possèdent pas d'autres homologues détectables avec la Fn (Pierschbacher *et al.*, 1981; Ruoslahti & Pierschbacher, 1986). La présence de la séquence RGDS dans le virus de la Fièvre jaune, le virus de la Fièvre aphteuse et le virus de l'influenza A permet l'entrée des virus dans les cellules hôtes par l'intermédiaire des récepteurs cellulaires pour la séquence RGD. La séquence RGD joue également un rôle dans le phénomène d'agrégation de *Dictyostelium discoïdeum* (Poole *et al.*, 1982; Gabius *et al.*, 1985). En effet, la moisissure existe à l'état unicellulaire pendant son repas bactérien, mais se différencie en un stage agrégé lorsque le milieu nutritif s'appauvrit. Les travaux qui ont été réalisés dans notre laboratoire ont permis de mettre en évidence des récepteurs pour la Fn à la surface des formes infectantes (les trypanomastigotes) de *Trypanosoma cruzi* (Ouaissi *et al.*, 1984). Ces récepteurs de surface jouent un rôle dans la reconnaissance et l'adhérence des parasites aux cellules (Ouaissi *et al.*, 1984). De même, l'utilisation de peptides synthétiques a permis de démontrer que la Fn se fixe aux récepteurs parasitaires par la séquence RGD. De plus, les anticorps polyclonaux ou monoclonaux anti-Fn et des anticorps anti-récepteur parasitaire sont capables d'inhiber l'infection des cellules par le parasite *in vitro* (Ouaissi *et al.*, 1986). Plus récemment, Wyler *et al.*, (1985) ont montré que la Fn se fixe à la surface des promastigotes de *Leishmania* et permet l'attachement des parasites à la surface des cellules hôtes.

III. LA CONNAISSANCE DES ANTIGENES DES LEISHMANIES

Au cours des soixante dernières années, les caractères antigéniques généraux des leishmanies ont pu être définis par les techniques sérologiques. Cependant, l'étude analytique et comparative de leurs antigènes constitutifs n'a été abordée de manière rationnelle que récemment, grâce à la précipitation en gel. Le recours simultané à diverses méthodes devrait permettre d'élucider la structure et la fonction des antigènes leishmaniens.

La structure antigénique des *Leishmania* reste essentiellement étudiée au niveau des promastigotes de culture. Elle apparaît constituée par une mosaïque complexe d'antigènes spécifiquement parasitaires et d'antigènes ubiquitaires. Ceux-ci présents en minorité, correspondent à des composants partagés par les Mycobactériacæ, à des polysides de type C et vraisemblablement, à des antigènes apparentés à ceux de l'hôte.

Les antigènes parasitaires proprement dits peuvent être caractérisés à trois niveaux principaux : (a) des exoantigènes, libérés dans le milieu externe (du moins *in vitro*) aux deux stades du parasite; (b) des antigènes de surface et (c) des antigènes somatiques. Sans pouvoir actuellement apprécier les relations immunologiques entre ces divers niveaux, les deux premiers types d'antigènes expriment *pro parte* une spécificité taxonomique étroite tandis que les antigènes somatiques sont représentatifs de la structure antigénique générale du parasite.

Les antigènes de surface de promastigotes des leishmanies pourraient être impliqués dans l'immunité. En effet, l'immunité protectrice obtenue lors de l'injection de promastigotes de *L. tropica* irradiés chez des souris sensibles à l'infection, suggère fortement la participation des anticorps dirigés contre les antigènes de surface du parasite dans cette protection (Howard *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 *et al.*, 1981). L'identification et la caractérisation de ces antigènes ont été faites dans différents laboratoires par des méthodes d'immunologie, de biochimie et de biologie moléculaire.

1. Utilisation des lectines pour l'étude des Trypanosomatidae

Les lectines ont été tout d'abord reconnues et mises en évidence chez les végétaux. La plus notable d'entre elles est la concanavoline extraite de *Canavalia ensiformis*. C'est leur étroite spécificité pour un mono- ou oligosaccharide qui en fait un outil de choix dans les domaines très variés de la recherche biologique et médicale (Lis & Sharon, 1986). La classification des lectines repose sur leur affinité pour des sucres simples (mannose, D-glucose, L-fucose, D-galactose, GlcNAc et acide N-acétylneuraminique)

C'est Dwyer (1974) qui, le premier, a eu l'idée de mettre en présence un Protozoaire et une lectine. Depuis, de nombreux auteurs ont montré la présence de glucides à la surface membranaire d'un grand nombre de Trypanosomatidæ. Ces études ont porté sur la nature et la densité de ces glucides. Elles ont été d'autant plus nombreuses qu'il est devenu rapidement évident que les glycoprotéines, dans la composition desquelles entrent ces derniers, sont essentielles dans les relations hôte-parasite en ce qui concerne les infections par *Leishmania* (Dwyer & Gottlieb, 1983; Datta & Majumdar, 1986) et *Trypanosoma cruzi* (Snary, 1983; Snary *et al.*, 1984; Villalta & Kierszenbaum, 1985; Kirkpatrick & Terway-Thomson, 1986).

Plusieurs auteurs (Pereira *et al.*, 1981; Handman *et al.*, 1983; Ayesta *et al.*, 1985; Choromanski *et al.*, 1984; Nagakura *et al.*, 1986) ont étudié la pathogénicité des différentes populations ou de différentes formes évolutives de ces parasites, en relation avec la nature des glycoprotéines membranaires. Les lectines ont été utilisées pour l'identification des résidus glucidiques exposés à la surface des promastigotes, selon l'âge des cultures (Doran & Herman, 1981). Des tests ont été effectués sur les différentes formes des cycles de *T. rhodesiense* (Jackson & Diggs, 1983) et de *L. donovani* (Wilson & Pearson, 1984). Dans une étude des réactions de surface de quelques souches de *Leishmania*, Jacobson *et al.*, (1982) ont montré l'existence de relations entre les antigènes excrétés et les agglutinations par des lectines. Enfin, l'utilisation d'un large éventail de lectines, de spécificités différentes, a montré que la nature des glucides membranaires varie d'un genre et d'une espèce à l'autre (Gueugnot, 1980). Des études ont mis à profit cette constatation pour tenter de contribuer de la sorte à la taxonomie des *Leishmania* (Gueugnot *et al.*, 1984; Schottelius, 1982; Schottelius & Gonçalves da Costa, 1982). L'utilisation des lectines pour l'identification des glycoprotéines et des glycoconjugués sera développée en détail dans le chapitre suivant.

2. Utilisation de la méthode de radio-marquage et d'anticorps monoclonaux pour la caractérisation d'antigènes

Depuis plusieurs années les méthodes de biochimie et d'immunologie ont servies à distinguer les promastigotes de *L. tropica* et *L. major* parmi les autres espèces de *Leishmania*. Ces techniques comprenaient l'analyse électrophorétique d'enzymes et les facteurs excrétés-sécrétés (Chance & Walton, 1980). Récemment les anticorps monoclonaux ont été utilisés pour distinguer les diverses espèces de *Leishmania* (McMahon-Pratt *et al.*, 1982; Jaffe & McMahon-Pratt, 1983; Jaffe *et al.*, 1984; McMahon-Pratt *et al.*, 1985). Ces anticorps ont également permis de purifier les antigènes parasitaires (Handman *et al.*, 1984; McMahon-Pratt & David, 1982; Chang & Chang, 1986). Certains de ces antigènes semblent être impliqués dans l'invasion des cellules hôtes par les parasites et peuvent jouer un rôle dans l'induction d'immunité protectrice ou d'immunosuppression (Alexander & Russell, 1985; Chang & Chang, 1986; Mitchell & Handman, 1986). Par ailleurs, les anticorps monoclonaux ont permis d'étudier les mécanismes de différenciation (McMahon-Pratt & David, 1982) et les processus de présentation d'antigènes parasitaires à la surface des macrophages infectés (Williams *et al.*, 1986).

2.1. Les Lipides et Lipopolysaccharides

La réponse immune dans diverses formes de *Leishmania* est très variable. Par exemple, la guérison d'une leishmaniose cutanée dépend de l'immunité à médiation cellulaire. Dans ce cas le faible taux d'anticorps (Bray & Lainson, 1967) peut rendre le diagnostic très difficile, c'est pour cela que Slutzky *et al.* (1985) se sont intéressés à l'identification d'antigènes ayant des composants lipidiques ou lipopolysaccharidiques. Ils ont utilisés une méthode de "radio-immunoassay" en utilisant les lipides (Smolarsky, 1980) qui a été mise au point pour les antigènes lipidiques de *Plasmodium berghei* (Frankenburg *et al.*, 1984).

La propriété des antigènes de nature lipidique en tant qu'immunogène est bien connue (Rapport & Graf, 1969; Marcus & Schwarting, 1976; Alving, 1977). C'est ainsi que les antigènes de groupe sanguin, l'antigène \emptyset du thymus murin et l'antigène Forssman contiennent

un sphingoglycolipide. De plus, les glycolipides sont présents dans les récepteurs pour les toxines bactériennes. Par l'extraction de promastigotes en hexane/propane, Slutzky *et al.* ont obtenu les "lipopolysaccharide-like" antigènes (LPS-like) qui sont immunologiquement actifs. Ils ont aussi identifié les facteurs excrétés-sécrétés des leishmanies de nature polysaccharidique (Slutzky & Greenblatt, 1982) pendant que Semprevivo & MacLeod (1981) ont identifié un complexe glycolipidique. Tous les antigènes décrits contiennent également des déterminants antigéniques sucrés, comme le lipopolysaccharide (Chagastoxin) de *T. cruzi* (Seneca & Peer, 1966) et le facteur lytique contenu dans la fraction lipidique de *L. donovani*, *L. mexicana* et *T. cruzi* (O'Daly & Aso, 1979).

2.2. Les Glycoconjugués

Jaffe & Sarfstein (1987) ont développé des anticorps monoclonaux spécifiques de *L. tropica*. Ces anticorps ont permis d'identifier certaines molécules présentes à la surface des promastigotes et d'autres libérées par des parasites dans le milieu de culture. L'immunoprécipitation de molécules marquées métaboliquement avec le ^3H -glucose, le ^3H -glucosamine, la ^{35}S -méthionine et aussi marquées à la surface par l'iode 125, a révélé des déterminants antigéniques dont le poids moléculaire varie entre 12 et 14 kDa. Ces anticorps monoclonaux non seulement précipitent un glycoconjugué de p.m. 32-44 kDa mais également d'autres molécules de p.m. 55, 80, 92 et 130 kDa. La perte de reconnaissance par ces anticorps après l'oxydation suggère la nature glucidique des molécules présentes à la surface des promastigotes de *L. tropica*.

Les glycoconjugués présents à la surface des leishmanies peuvent être très importants pour la survie du parasite à l'intérieur des phago-lysosomes. En effet, les sucres peuvent protéger les protéines contre la protéolyse dans divers systèmes (Sharon, 1984) et peuvent aussi être impliqués dans l'interaction cellule-cellule (Hyafil *et al.*, 1980; Berger & Armant, 1982; Pierce & Ballou, 1982). Les variations dans les glycoconjugués présents à la surface des leishmanies ont été étudiées par la méthode d'agglutination en utilisant différentes lectines (Dwyer, 1974, 1977; Petavy *et al.*, 1978; Doran & Herman, 1981; Hernandez, 1982; Schottelius, 1982; Schottelius & Gonçalves da Costa, 1982; Ebrahimzadeh & Jones, 1983; Gueugnot *et al.*, 1984; Wilson & Pearson, 1984; Ayesta *et al.*, 1985). Les variations intra- et

inter-espèces de divers stades suggèrent une modification au niveau de la glycosylation à la surface de ces parasites. Cette variation a été démontrée parmi les souches virulentes et non-virulentes de *L. braziliensis* (Hernandez, 1982; Ayesta *et al.*, 1985) et parmi les promastigotes infectieux et non-infectieux de *L. major* (Sacks *et al.*, 1985). Le traitement de *L. donovani* par la tunicamycine, un inhibiteur de la N-acétylglucosaminyltransférase, rend le parasite non-virulent ce qui suggère que les glycoconjugués jouent un rôle dans l'expression de la virulence des parasites (Nolan & Farrell, 1985). Des facteurs excrétés-sécrétés de nature glycannique liés à la membrane parasitaire ont été également mis en évidence dans divers parasites (Slutzky *et al.*, 1979; Jacobson *et al.*, 1982; Kaneshiro *et al.*, 1982). De nombreux auteurs suggèrent que le sucre joue un rôle important dans la régulation de la phagocytose du parasite (Handman & Greenblatt, 1977) et dans la modulation de la réponse immunologique humaine (Londner *et al.*, 1983).

Jaffe et McMahon-Pratt (1988) ont procédé à l'identification des glycoconjugués liés à la membrane des diverses espèces de *Leishmania*. En utilisant la concanavaline A et la lectine extraite de *Lens culinaris* (LCA), ils ont révélé les différents profils de glycoconjugués à la surface des leishmanies étudiées. Cette étude a montré qu'un composant de p. m. 41-52 et 160-185 kDa est commun à toutes les espèces.

Le rôle biologique des composants excrétés-sécrétés (Schnur *et al.*, 1972, 1973) par différentes leishmanies a été décrit par de nombreux auteurs. Certains de ces composants semblent être communs dans les formes promastigotes et amastigotes de *Leishmania* et peuvent être exprimés à la surface des macrophages infectés (Schnur *et al.*, 1972; de Ibarra *et al.*, 1982). Le nombre et la nature de ces antigènes sécrétés ne sont pas encore déterminés (Slutzky & Greenblatt, 1977, 1979; Slutzky *et al.*, 1979; El-On *et al.*, 1979; Hernandez *et al.*, 1980; Semprevivo & Macleod, 1981; Kaneshiro *et al.*, 1982). Cependant Handman *et al.* (1984) ont commencé la caractérisation biochimique de ces antigènes en utilisant deux anticorps monoclonaux déjà décrits (Handman & Hocking, 1982; de Ibarra *et al.*, 1982; Greenblatt *et al.*, 1983). L'emploi de ces anticorps a permis de caractériser un glycoconjugué amphipatique de p. m. 20-67 kDa. Ce glycoconjugué peut être marqué par le ^3H -glucose, l' ^3H -acide palmitique, le ^{32}P -phosphate et le ^{35}S -sulfate. Ils ont aussi démontré que ce glycoconjugué est lié à la membrane parasitaire et peut être sécrété dans le milieu de culture après avoir été découpé par une enzyme du parasite. Il semble que la phospholipase C décrite par Dwyer &

Gottlieb (1983) chez *L. donovani* peut intervenir dans cet effet. Ce glycoconjugué contient du galactose et donc reconnu par les lectines spécifiques. Les résultats obtenus après marquage de ce glycoconjugué par le ^3H -borohydrure et traitement par la galactose oxydase suggèrent la présence sur cette molécule de résidus galactosylés. La séparation de phase en utilisant le détergent Triton x-114 (Bordier, 1981) a démontré qu'une grande partie de la molécule se trouve dans la phase hydrophile et très peu dans la phase hydrophobe du détergent ce qui s'explique la présence de peu de protéines dans le glycoconjugué. Ce glycoconjugué peut se fixer à la surface des macrophages, mais ne se fixe pas aux cellules T et B.

Turco *et al.* (1984) ont démontré la synthèse d'un glycoconjugué par *L. donovani* qu'ils ont nommé lipophosphoglycane (LPG). Cette molécule est un complexe de p.m. 10-20 kDa, c'est un polymère de disaccharide de phosphorylgalactosyl- β -mannose contenant un domaine hydrophobe. Certains glyconjugués déjà décrits chez un grand nombre d'espèces de leishmanies (Barreto-Berger *et al.*, 1981; Hernandez, 1983; Handman *et al.*, 1984) pourraient être similaires au LPG. Le LPG s'exprime surtout à la surface des promastigotes en phase stationnaire et pourrait être impliqué dans l'infectivité des promastigotes. Sacks *et al.* (1985) ont démontré que les promastigotes PNA⁻ sont plus infectieux. Puentes *et al.* (1988) pensent que cette absence d'agglutination pourrait être due à la modification du LPG à la surface des promastigotes. Sacks & da Silva (1987) ont montré que l'addition d'acide sialique aux parasites PNA⁻, modifie la migration de la molécule et augmente le marquage du LPG lors d'une oxydation par le périodate et de la réduction par le borohydrure. Dans le même laboratoire il a aussi été démontré que le site de fixation du composant C3 du complément est porté par ce LPG, et que l'attachement des promastigotes à la surface des macrophages s'effectue par l'intermédiaire du récepteur CR1 du complément.

2.3. Les Glycoprotéines

Les molécules exposées à la surface des leishmanies jouent un rôle important lors de l'établissement de l'infection et de la multiplication du parasite dans les cellules hôtes (Chang & Fong, 1983). On peut supposer que ces molécules auront été plus au moins conservées d'une espèce à l'autre au cours de l'évolution.

La technique du marquage des composants de surface des cellules a été largement utilisée

pour l'identification des antigènes de surface des parasites. Pour autant que les cellules restent intactes durant les manipulations, seules les protéines exposées à la surface externe des cellules seront marquées. Le marquage à l'Iode-125 induit par le IODOGEN est le plus efficace (Fraker & Speck, 1978; Gardiner & Dwyer, 1983).

Des études préliminaires sur les composants de surface des promastigotes de *L. tropica* ont montré par analyse en gel de polyacrylamide en dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) la présence de six polypeptides majeurs radiomarqués de différents poids moléculaires (Handman & Curtis, 1982). Le rôle de ces protéines dans l'immunité n'a pas été étudié. Plus récemment, en utilisant les sérums de sujets atteints de kala-azar, une glycoprotéine majeur de 64 kDa a été décrite à la surface de *L. donovani* (Lepay *et al.*, 1983). Une protéine de surface ayant un poids moléculaire similaire a été également identifiée sur différentes souches de *L. donovani* (Ramasamy *et al.*, 1983) et sur plusieurs autres espèces de *Leishmania* de l'Ancien et du Nouveau Monde (Fong & Chang, 1982; Gardiner *et al.*, 1984). Bordier *et al.* (1984) ont démontré que la gp63 constitue 70% des antigènes de surface des promastigotes marqués à l'iode 125 chez *L. donovani* et *L. majeur*. Chez *L. tropica* le marquage était plus faible et moins sélectif. Les protéines qui sont partie intégrante de la membrane par la partie hydrophobe des lipides membranaires, peuvent être identifiées et isolées des autres protéines de la cellule par séparation de phases dans une solution de détergent non-ionique Triton X-114 (Bordier, 1981). Lorsque les promastigotes des trois espèces marqués sont soumis à une telle séparation, les glycoprotéines de 63 kDa (gp63) sont récupérées, enrichies environ 50 fois par rapport aux autres protéines cellulaires et avec un haut rendement dans la phase détergent. Ce travail a été également élaboré pour étudier l'homologie de structure des glycoprotéines des trois espèces de *Leishmania* étudiées. La réactivité immunologique croisée des trois glycoprotéines a été mise en évidence après transfert des antigènes parasitaires sur une feuille de nitrocellulose et révélation par un sérum de chien infecté par *L. donovani*. Le résultat montre que les anticorps induits par l'infection réagissent fortement avec gp63 des trois espèces. Ce résultat suggère une certaine homologie immunologique entre ces trois glycoprotéines, mais ne démontre pas que cette homologie provient des parties protéiques des différentes gp63. L'homologie des séquences de gp63 des trois espèces étudiées a finalement été démontrée en comparant leur cartes peptidiques obtenues par digestion à la N-chlorosuccinimide et analyse des peptides sur gel de polyacrylamide (Lischwe & Ochs,

1982). Une homologie complète est observée entre les cartes de *L. donovani* et *L. major* alors que la carte de *L. tropica* est différente.

D'autres laboratoires ont également démontré que la gp63 est une glycoprotéine liée à la membrane des promastigotes par l'acide myristique (Etges *et al.*, 1986) et peut être coupée par le phospholipase C. Les récents travaux de Etges *et al.* (1986) ont montré que la gp63 est une protéase ayant une activité maximale à pH alcalin. Cette étude a été étendue à d'autres espèces de *Leishmania*. Les résultats obtenus par Bouvier *et al.*, (1987) ont montré que cette enzyme est commune à toutes les leishmanies étudiées. Chaudhuri & Chang (1988) ont cependant publié un an plus tard des résultats contradictoires où ils montrent que la gp63 de *L. mexicana* est une protéase acide. Chang & Fong (1982) ont développé un anticorps monoclonal qui reconnaît spécifiquement cette glycoprotéine à la surface des promastigotes de *L. mexicana*. Par la technique d'immunofluorescence indirecte ils ont démontré l'apparition de la gp63 lorsque les amastigotes se transforment en promastigotes *in vitro*. Cet anticorps a révélé en immunoprécipitation un antigène composé de quatre bandes de p.m. entre 66-60 kDa à partir des antigènes marqués à la ³⁵S-méthionine. L'expérience de chasse métabolique montre l'hétérogénéité et le polymorphisme de gp63 (Chang *et al.*, 1986). Le changement de mobilité électrophorétique après le traitement par la tunicamycine (Schwarz & Datema, 1982), suggère que le site de glycosylation se situe au niveau des résidus asparagine. Ils ont également démontré que l'anticorps anti-gp63 ou la gp63 purifiée, inhibe l'attachement du promastigote à la surface des macrophages. La gp63 pourrait donc jouer un rôle dans l'infectivité de *Leishmania*.

Des antigènes membranaires de même nature ont été également identifiés par immunoprécipitation en utilisant les anticorps polyclonaux et monoclonaux dans un grand nombre d'espèces et de sous-espèces de *Leishmania* (Handman & Curtis, 1982; Jaffe & McMahon-Pratt, 1983; Lepay & Cohen, 1983; Ramasamy & Jamnadas, 1983; Gardiner & Dwyer, 1984; Jaffe & McMahon-Pratt, 1984; Etges *et al.*, 1985; Sadick & Raff, 1985, Reed *et al.*, 1987). Cependant d'autres antigènes présents à la surface des leishmanies ont été également décrits. En particulier, on peut citer les antigènes de 46 kDa de *L. m. amazonensis* (Kahl & McMahon-Pratt, 1987), de 114 kDa de *L. tropica* (Sacks *et al.*, 1985), de 72 kDa de *L. donovani* (Jaffe & Zalis, 1988) et de 72 kDa de *L. braziliensis* (Legrand *et al.*, 1988) dont le rôle fonctionnel reste à explorer.

3. Le Rôle d'Antigènes de Surface dans l'Interaction Hôte-Parasite

Les travaux que j'ai décrits précédemment montrent que la surface parasitaire joue un rôle essentiel dans l'initiation de l'infection par le parasite, et qu'actuellement seule la gp63 et le LPG des promastigotes de *Leishmania* sont des candidats potentiels de vaccination contre les leishmanioses. L'intérêt de ces deux molécules porte sur le fait qu'elles jouent un rôle dans l'attachement des promastigotes à la surface des cellules hôtes, qui constituent la première étape de l'infection par le parasite.

Une longue liste de mécanismes d'interactions *Leishmania*-cellule hôte est disponible et pratiquement tous les mécanismes semblent passer par le biais de l'antigène majeur de surface: la gp63. L'inhibition d'attachement des promastigotes à la surface des macrophages par les anticorps monoclonaux anti-gp63 ou la gp63 purifiée est l'une des indications qui suggère que la gp63 joue un rôle dans l'infectivité de *Leishmania* vis-à-vis des cellules hôtes (Chang & Chang, 1986; Russell & Wilhelm, 1986). De même, la gp63 qui fixe et convertit le C3b en C3bi, utilise le CR3 du macrophage pour l'initiation de l'infection (Blackwell *et al.*, 1985; Russell, 1987). L'abondance du fucose et du mannose dans la gp63 peut faciliter l'attachement par le biais du récepteur pour le fucose-mannose. Nos travaux ont montré que la gp63 ayant une communauté de structure avec la Fn peut également utiliser le récepteur Fn de la cellule hôte. Cette communauté de structure concerne la séquence RGD qui est le site d'attachement de la Fn au récepteur cellulaire (Pierchbacher, *et al.*, 1981). Le clonage et le séquençage de la gp63 ont déjà révélé la présence d'une séquence RGD (Button & McMaster, 1988). Les travaux de Russell & Wright (1988) suggèrent que la séquence RGD de la gp63 peut se fixer directement au récepteur CR3 du macrophage.

Récemment, da Silva *et al.* (1988) ont montré que le LPG se fixe au récepteur CR1 du macrophage par le biais du complément C3 puisque ce dernier se fixe au LPG. Ces observations sont en contradiction avec celles de Russell concernant le site d'attachement du C3. En effet, ces auteurs montrent que le LPG est le site accepteur du C3 et non pas la gp63 montré par Russell (1987). Ils ont également montré que le LPG subit une modification qui est associée à l'acquisition de la virulence des promastigotes au cours leur maturation.

Disease is embedded in the environment of man.
Stallons

TRAVAUX PERSONNELS

Article 1

Spécificité au niveau des protéines de surface des promastigotes de *Leishmania donovani* (Laveran et Mesnil, 1903), *L. infantum* (Nicolle, 1908) et *L. chagasi* (Cunha et Chagas, 1937).

La plupart des parasites du genre *Leishmania* se multiplient dans deux micro-environnements différents: le système digestif des Phlébotomes et les cellules phagocytaires de mammifères. Les molécules exposées à la surface des leishmanias semblent jouer un rôle important lors de l'établissement de l'infection et de la multiplication du parasite dans ces deux environnements.

Le but de ce travail a été de mettre au point les techniques de marquage pour pouvoir étudier les antigènes parasitaires et leur rôle dans l'immunité. En effet, l'immunité protectrice obtenue lors de l'injection de promastigotes de *Leishmania tropica* irradiés chez des souris sensibles à l'infection, suggère fortement la participation des anticorps dirigés contre les antigènes de surface du parasite, dans cette protection.

Les promastigotes de *Leishmania donovani* (MHOM/IN/83/HS70), *L. chagasi*, (MHOM/BR/81/IMPERATRIZ) et *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP 263) ont été cultivés dans le milieu monophasique pour obtenir les parasites sans débris cellulaires. La composition protéique de la surface des promastigotes de ces trois espèces a été analysée après marquage à ^{125}I induit par un catalyseur, le IODOGEN. Après le marquage, la totalité des protéines cellulaires a été analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium, et les molécules radio-iodinées ont été révélées par fluorographie.

Les résultats d'analyse électrophorétique comparative du profil polypeptidique montrent certaines similitudes ainsi que la différence dans les profils peptidiques de ces trois espèces étudiées. On observe que la protéine majeure d'environ 50 kDa, présente à la surface des promastigotes de *L. donovani* et *L. chagasi*, est absente de la surface de *L. infantum*. Par contre, cette dernière exprime de façon majeure en surface, un doublet de protéines d'un poids moléculaire apparent de 25-23 kDa. Les sérums de souris immunisées avec des promastigotes et des anticorps monoclonaux produits contre *L. donovani* et *L. chagasi*, montrent en immunofluorescence indirecte, la même discordance au niveau de ces espèces, à savoir que les

anticorps dirigés contre *L. chagasi* reconnaissent de la même façon la surface de *L. donovani*, et réciproquement. Par contre, les immunosérums anti-*L. infantum* ne réagissent qu'avec les formes de culture homologues.

CONCLUSION

Ce premier travail nous a permis tout d'abord de mettre au point la technique de marquage de surface des promastigotes de *Leishmania*. Le chloramide 1,3,4,6-tetrachloro-3 α , 6 α -dephenylglycoluril (IODOGEN) s'est révélé être le meilleur catalyseur pour le marquage par radio-iodination des antigènes de surface des promastigotes par rapport aux autres catalyseurs couramment utilisés. Pour autant que les cellules restent intactes durant les manipulations, seules les protéines exposées à la surface externe des cellules sont marquées.

La comparaison entre ces trois espèces montre clairement une grande similitude entre *L. chagasi* et *L. donovani* au niveau des protéines de surface de ces espèces. Ainsi, l'expression de certaines protéines semble différente à la surface des promastigotes de *L. infantum*. Par exemple, la protéine majeure de 50 kDa est absente de la surface de *L. infantum*, mais il exprime un doublet de protéines d'un poids moléculaire apparent de 25-23 kDa. Les antigènes spécifiques de surface des différentes formes des *Leishmania* pourraient jouer un rôle dans l'immunité.

**Spécificité au niveau des protéines de surface
des promastigotes de
Leishmania donovani (Laveran et Mesnil, 1903)
Leishmania infantum Nicolle, 1908
et *Leishmania chagasi* Cunha et Chagas, 1937**

F. Santoro *, J.L. Lemesre *, F.S. Rizvi *, D. Afchain * et M. Sadigursky **

RÉSUMÉ — Les protéines de surface, marquées à ^{125}I , des promastigotes de *Leishmania donovani* (MHOM/IN/83/HS 70), *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP 263) et *L. chagasi* (MHOM/BR/81/IMPERATRIZ) ont été comparées par analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE). Quatre protéines majeures marquées, d'un poids moléculaire apparent de 65 000, 60 000, 50 000 et 26 000, sont détectées à la fois sur les promastigotes de *L. donovani* et de *L. chagasi*. Par contre, le profil polypeptidique iodé de *L. infantum* ne montre seulement que deux bandes majeures d'un poids moléculaire apparent de 62 000 et un doublet de 25 000 - 23 000. Des expériences d'immunoprécipitation, à l'aide de sérums de Souris infectées avec des promastigotes ou immunisées, confirment les différences antigéniques de surface observées entre ces espèces. Finalement, des anticorps monoclonaux, produits contre la surface de promastigotes de *L. chagasi* ou de *L. donovani*, réagissent réciproquement mais ne reconnaissent pas les promastigotes de *L. infantum*.

MOTS-CLÉS — *Leishmania donovani* — *Leishmania infantum* — *Leishmania chagasi* — Protéines de surface
— Anticorps monoclonaux — Antigènes marqués à l'iode radioactif.

INTRODUCTION

Les antigènes de surface des formes promastigotes des *Leishmania* pourraient être impliqués dans l'immunité. En effet, l'immunité protectrice obtenue lors de l'injection de promastigotes de *L. tropica* irradiés chez des Souris sensibles à l'infection, suggère fortement la participation des anticorps dirigés contre les antigènes de surface du parasite, dans cette protection [6]. Dans d'autres études, l'injection de promastigotes morts de *L. donovani*, en présence d'adjuvant, a induit un bon degré de protection chez la Souris [4].

Des études préliminaires sur les composants de surface des promastigotes de *L. tropica* ont montré par analyse en SDS-PAGE la présence de six polypeptides majeurs radiomarqués de différents poids moléculaires [5]. Le rôle de ces protéines dans l'immunité n'a pas été étudié. Plus récemment, en utilisant le sérum de sujets atteints de kala-azar, une glycoprotéine majeure de 64 Kd a été décrite à la surface de *L. donovani* [9]. La présence d'une glycoprotéine similaire au niveau de la surface d'autres espèces de *Leishmania* ainsi que le rôle de la 64 Kd dans l'immunité ne sont pas connus.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les promastigotes de *L. donovani* (MHOM/IN/83/HS 70), *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP 263) et *L. chagasi* (MHOM/BR/81/IMPERATRIZ) sont cultivés dans le milieu monophasique liquide GLSH [10]. Toutes les formes promastigotes utilisées dans ce travail ont été récoltées après trois jours de culture *in vitro*.

* Centre d'Immunologie et de Biologie parasitaire, Institut Pasteur, Lille, France.

** Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brasil.

Les protéines de surface des promastigotes de ces trois espèces ont été marquées à l' ^{125}I par la technique de l'Iodo-gen [2] et comparées par analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide-SDS [7].

La technique d'immunoprécipitation d'extraits de promastigotes marqués en surface à l' ^{125}I par des sérums de Souris infectées par les différentes espèces, suivie d'une adsorption des immunocomplexes sur la protéine A-Sépharose puis d'une analyse en SDS-PAGE des immunocomplexes dissociés, a permis l'identification des antigènes marqués par autoradiographie [1].

Les promastigotes des trois espèces après trois jours de culture ont servi :

- à l'infection de Souris consanguines BALB/c par voie intra-péritonéale, à l'aide de $2,5 \times 10^7$ formes promastigotes vivantes par animal;
- à l'immunisation de Souris consanguines BALB/c à l'aide de formes promastigotes lavées puis fixées dans une solution de PBS contenant 0,1 % de glutaraldéhyde. Chaque Souris a subi quatre immunisations successives. Ces animaux immunisés ont aussi servi à la production d'anticorps monoclonaux anti-*L. chagasi* et anti-*L. donovani*, par fusion de leurs cellules spléniques avec des cellules myélomateuses SP 2/0. La sélection des hybrides producteurs d'anticorps a été réalisée par les techniques d'immunofluorescence indirecte et radioimmunologique (RIA) sur support solide. Les clones sélectionnés par la technique de dilution limite sont multipliés sur ascites de Souris BALB/c.

RÉSULTATS

ANALYSE ÉLECTROPHORÉTIQUE COMPARATIVE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE-SDS DES PROTÉINES DE SURFACE, MARQUÉES À L' ^{125}I , DES PROMASTIGOTES DE *L. DONOVANI*, *L. CHAGASI*, ET *L. INFANTUM*

Après marquage de la surface par l' ^{125}I des promastigotes des trois espèces de *Leishmania*, l'analyse en SDS-PAGE révèle un profil polypeptidique relativement simple. En effet, comme le montre la figure 1, quatre protéines majeures marquées, d'un poids moléculaire apparent de 65 000, 60 000, 50 000 et 26 000 daltons sont détectées à la fois sur les promastigotes de *L. donovani* et de *L. chagasi*. Par contre, le profil peptidique iodé de *L. infantum* ne montre que deux bandes majeures d'un poids moléculaire apparent de 62 000 et un doublet de 25 000-23 000.

Ainsi, au niveau de l'expression des protéines de surface des promastigotes, il apparaît que *L. infantum* présente des différences notables par rapport à *L. donovani* et *L. chagasi*, qui apparaissent très proches.

IMMUNOPRÉCIPITATION À L'AIDE DES SÉRUMS DE SOURIS INFECTÉES, D'EXTRAITS DE PROMASTIGOTES MARQUÉS EN SURFACE PAR L' ^{125}I

La figure 2 illustre le profil des protéines de surface des promastigotes des différentes espèces, immunoprécipitées par les sérums de souris BALB/c infectées avec des promastigotes de *L. chagasi* ou de *L. infantum*. Les sérums de Souris, infectées par *L. chagasi* reconnaissent la bande majeure de surface de 50 000 daltons aussi bien au niveau de *L. chagasi* que de *L. donovani*; comme précédemment (fig. 1), la bande de 50 000 daltons a une mobilité électrophorétique très légèrement inférieure pour *L. chagasi*. Ce même sérum de Souris, infectée par *L. chagasi*, reconnaît chez *L. infantum* des bandes mineures de 43 000, 38 000 et 34 000 daltons et une seule bande du doublet de 25 000 daltons.

Par contre, les sérums de Souris infectées avec *L. infantum*, s'ils reconnaissent chez *L. infantum* les bandes de 43, 38, 34 et 25 Kd, ne reconnaissent rien au niveau de la surface de *L. chagasi* et *L. donovani*.

Ainsi, ces expériences d'immunoprécipitation, à l'aide de sérums de Souris infectées avec des promastigotes, confirment les différences antigéniques de surface observées entre ces taxa.

DIFFÉRENCES DE RÉACTIVITÉ DE SURFACE OBSERVÉES EN IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE À L'AIDE DE SÉRUMS DE SOURIS IMMUNISÉES ET D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Les sérums de Souris immunisées avec des promastigotes fixés à la glutaraldéhyde (0,1 %) ont été testés contre des promastigotes des trois espèces, en immunofluorescence indirecte. Cette technique, réalisée sur des promastigotes fixés à la glutaraldéhyde (0,1 %), permet d'apprécier l'immunofluorescence au niveau de la surface des formes de culture.

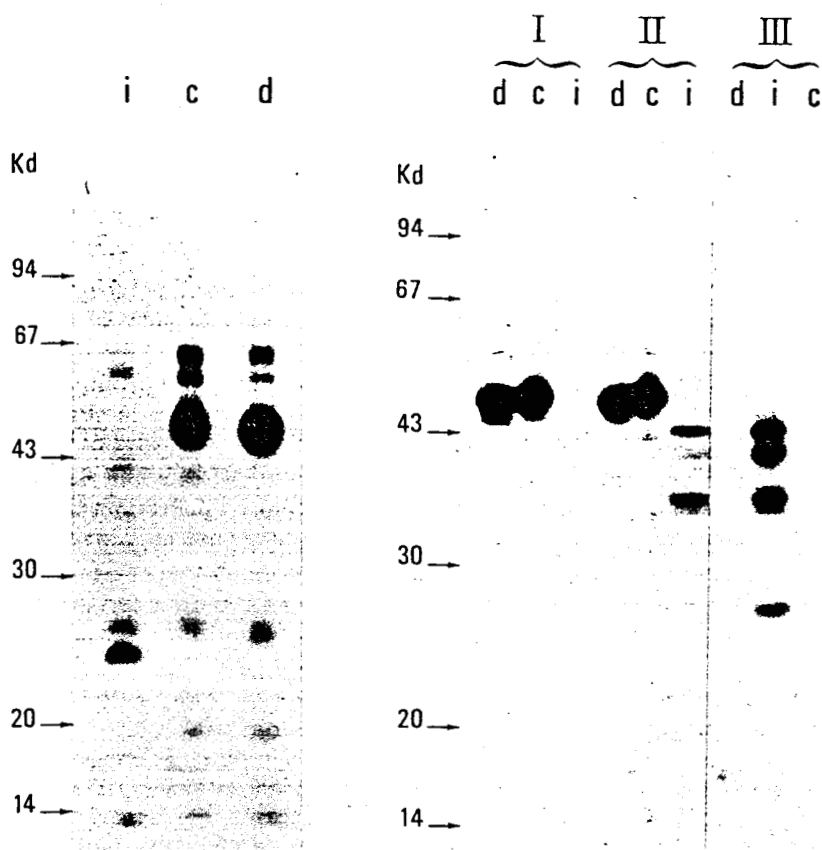


Figure 1

Figure 2

Figure 1 (à g.) — Caractérisation des protéines de surface des promastigotes de *Leishmania infantum* (i), *L. chagasi* (c) et *L. donovani* (d) par autoradiographie après analyse en gel de polyacrylamide-SDS.

Figure 2 (à dr.) — Immunoprécipitation des antigènes de surface, marqués à l'¹²⁵I, de promastigote de *Leishmania chagasi* (c), de *L. donovani* (d) et de *L. infantum* (i) par des sérums de Souris infectées avec des promastigotes vivants de *L. chagasi* (I, 44 jours d'infection; II, 62 jours d'infection) ou de *L. infantum* (III, 44 jours d'infection).

Comme le montre le tableau I, les réactions sont pratiquement identiques entre *L. chagasi* et *L. donovani* avec les immunosérums respectifs. Par contre, aucune réaction croisée n'est observée avec *L. infantum*. Inversement, les immunosérums anti-*L. infantum* ne réagissent qu'en réaction homologue.

TABLEAU I

Analyse comparée, en immunofluorescence indirecte, de la réactivité de surface des promastigotes de *Leishmania chagasi*, *L. donovani* et *L. infantum* vis-à-vis de sérums de Souris immunisées par ces promastigotes, et d'anticorps monoclonaux anti-*L. chagasi* et *L. donovani*.

	Immunofluorescence indirecte sur des promastigotes de :		
	<i>L. chagasi</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i>
SOURIS			
— anti- <i>L. chagasi</i>	+	+	—
— anti- <i>L. donovani</i>	+	+	—
— anti- <i>L. infantum</i>	—	—	+
ANTICORPS MONOCLONAUX			
— anti- <i>L. chagasi</i>	+	+	—
— anti- <i>L. donovani</i>	+	+	—

Tous les anticorps monoclonaux produits contre la surface de *L. chagasi* ou de *L. donovani* réagissent en immunofluorescence indirecte, à la fois sur des promastigotes de *L. chagasi* et de *L. donovani*, mais ne reconnaissent pas les promastigotes de *L. infantum* (tableau I).

DISCUSSION

Nos résultats d'analyse électrophorétique comparative du profil polypeptidique et d'immunoprécipitation par des sérums de Souris infectées, des protéines de surface marquées à l'¹²⁵I de *L. chagasi*, *L. donovani* et *L. infantum*, confirment les travaux précédents [3, 9].

La comparaison entre ces trois espèces montre clairement que la protéine majeure de 50 Kd, observée à la surface de *L. chagasi* et de *L. donovani*, est absente de la surface de *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP 263, isolée d'un sujet marocain). Par contre, cette dernière exprime d'une façon majeure en surface, un doublet de protéines d'un poids moléculaire apparent de 25-23 Kd.

Il est important de signaler une très légère variabilité électrophorétique au niveau de la 50 Kd de *L. chagasi* et *L. donovani*; ceci semble être assez fréquent chez les *Leishmania* [3].

Les sérums de Souris immunisées avec des promastigotes et des anticorps monoclonaux produits contre *L. chagasi* et de *L. donovani*, montrent, en immunofluorescence indirecte, la même discordance au niveau de ces espèces, à savoir que les anticorps dirigés contre *L. chagasi* reconnaissent de la même façon la surface de *L. donovani*, et réciproquement. Par contre, les immunosérums anti-*L. infantum* ne reconnaissent que les formes de culture homologues.

Ainsi, l'analyse comparative des molécules de surface des trois espèces permet de distinguer deux entités différentes. Une grande similitude est observée entre *L. chagasi* et *L. donovani* au niveau des protéines de surface des promastigotes de culture. Les études isoenzymatique réalisées [8] ne semblent pas indiquer une telle divergence. Néanmoins, nos expériences d'immunoprécipitation montrent qu'il existe une grande similitude dans la structure moléculaire de ces trois espèces, mais que l'expression de surface de certaines protéines semble différente.

Ce premier apport expérimental à la solution d'un problème taxonomique particulièrement complexe demande à être confirmé. Il le sera, dans le cadre de nos recherches, par l'analyse d'un plus grand nombre de souches, au moyen des anticorps monoclonaux.

REMERCIEMENTS

Ce travail a reçu un support financier de la Commission des Communautés européennes, de la Rockefeller Foundation et du Programme Spécial PNUD/Banque Mondiale/OMS de Recherche et de Formation concernant les Maladies tropicales.

Nous remercions MM. M. Loyens et D. Deslée pour leur précieux concours technique et Mme Massard pour la préparation du manuscrit.

Specificity of the surface proteins of promastigotes of *Leishmania donovani* (Laveran et Mesnil, 1903), *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 and *Leishmania chagasi* Cunha et Chagas, 1937

SUMMARY — Radioiodinated surface proteins of promastigotes from *Leishmania donovani* (MHOM/IN/83/HS 70), *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP 263), and *L. chagasi* (MHOM/BR/81/IMPERATRIZ) were compared by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Four major labelled proteins with apparent M.w. of 65 000, 60 000, 50 000 and 26 000 were detected in both *L. donovani* and *L. chagasi* promastigotes. Nevertheless, the radioiodinated polypeptide pattern of *L. infantum* only showed two major bands with apparent M.w. of 62 000 and a doublet of 25 000-23 000. Immunoprecipitation experiments using sera from mice infected with promastigotes or immunized confirmed the surface antigenic differences between these species. Finally, monoclonal antibodies generated against the surface of *L. chagasi* or *L. donovani* cross-reacted reciprocally, but failed to recognize *L. infantum* promastigotes.

KEY-WORDS — *Leishmania donovani* — *Leishmania infantum* — *Leishmania chagasi* — Surface proteins — Monoclonal antibodies — Radioiodinated antigens.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Dissous C., Dissous C., Capron A. — Isolation and characterization of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1981, 3, 215-225.
- [2] Fraker P.J., Speck J.C. — Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloramide 1, 3, 4, 6-tetrachloro-3 α , 6 α -dephenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, 80, 849-857.
- [3] Gardiner P.R., Jaffe C.L., Dwyer D.M. — Identification of cross-reactive promastigote cell surface antigens of some leishmanial stocks by ¹²⁵I labelling and immunoprecipitation. *Infect. Immun.*, 1984, 43, 637-643.
- [4] Holbrook T.W., Cook J.A., Parker B.W. — Immunization against *Leishmania donovani* : glucan as an adjuvant with killed promastigotes. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 1981, 30, 762-768.
- [5] Handman E., Curtis J.M. — *Leishmania tropica* : surface antigens of intracellular and flagellate forms. *Expl Parasitol.*, 1982, 54, 243-249.
- [6] Howard J.G., Nicklin S., Hale C., Liew F.Y. — Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. I. Protection induced in mice genetically vulnerable to fatal *Leishmania tropica* infection. *J. Immunol.*, 1982, 129, 2206-2212.
- [7] Laemmli U.K. — Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, London, 1970, 227, 680-685.
- [8] Lanotte G., Rioux J.A., Maazoun R., Pasteur N., Pralong F., Lepart J. — Application de la méthode numérique à la taxonomie du genre *Leishmania* Ross, 1903. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien Monde. Utilisation des allozymes. Corollaires épidémiologiques et phylétiques. *Annls Parasit. hum. comp.*, 1981, 56, 575-592.
- [9] Lepay D.A., Nogueira N., Cohn Z. — Surface antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. *J. expl Med.*, 1983, 157, 1562-1572.
- [10] Le Ray D., Afchain D., Jadin J., Capron A., Yasarol S., Lanotte G., Fameree L. — Diagnostic immunoelectrophorétique de la leishmaniose viscérale à l'aide d'un extrait antigénique hydrosoluble de *Leishmania donovani*. Résultats préliminaires. *Ann. Soc. belg. Méd. trop.*, 1973, 53, 31-41.

Article 2

**Etude sur la spécificité des antigènes de surface des promastigotes
du complexe *Leishmania donovani*.**

Dans cet article nous avons vérifié les travaux précédents en utilisant les méthodes de marquage et d'immunoprécipitation avec les sérums de patients atteints de leishmaniose viscérale et les sérums d'animaux infectés ou immunisés avec les promastigotes de trois espèces de *Leishmania*.

Ces résultats peuvent être résumés comme suit: les protéines de surface, marquées à l'I¹²⁵, des promastigotes de *L. donovani*, *L. infantum* et *L. chagasi* ont été comparées par analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide-SDS. Quatre protéines majeures marquées, d'un poids moléculaire apparent de 65, 60, 50 et 26 kDa sont détectées à la fois sur les promastigotes de *L. donovani* et de *L. chagasi*. Par contre, le profil polypeptidique iodé de *L. infantum* ne montre seulement que deux bandes majeures d'un poids moléculaire apparent de 62 kDa et un doublet de 25-23 kDa.

Des expériences d'immunoprécipitation, à l'aide de sérums de patients atteints de Kala-azar et de sérums de lapins et de souris immunisés soit avec *L. infantum* ou *L. chagasi*, confirment les différences antigéniques de surface observées entre ces sous-espèces. Finalement, des anticorps monoclonaux, produits contre la surface de promastigotes de *L. chagasi* réagissent avec *L. donovani* et précipitent une molécule de 65 kDa mais ne reconnaissent pas les promastigotes de *L. infantum*.

CONCLUSION

Les résultats dans cet article confirment les travaux précédents. L'analyse comparative des molécules de surface des trois espèces a révélé une grande similitude entre *L. chagasi* et *L. donovani* au niveau des protéines de surface des promastigotes de culture. Cependant, les études isoenzymatiques réalisées ne semblent pas indiquer une telle divergence. Néanmoins, nos expériences d'immunoprécipitation montrent qu'il existe une grande similitude dans la structure moléculaire de ces trois espèces, mais que l'expression de surface de certaines protéines semble différente.

Les résultats peuvent être considérés dans le contexte des problèmes taxonomiques particulièrement complexes. Les antigènes spécifiques des différentes espèces pourront être intégrées à la panoplie des critères d'identification et de taxonomie des *Leishmania*. D'autre, part la spécificité antigénique pourrait expliquer la grande diversité des hôtes définitifs et des vecteurs, ainsi que leur distribution géographique.

Subspecies-Specific Surface Antigens of Promastigotes of the *Leishmania donovani* Complex

JEAN-LOUP LEMESRE,¹ FARRUKH S. RIZVI,¹ DANIEL AFCHAIN,¹ MOYSES SADIGURSKY,²
 ANDRE CAPRON,¹ AND FERRUCIO SANTORO^{1*}

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM 167-CNRS 624, Institut Pasteur, 59019 Lille Cédex, France,¹ and Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-UFBA, 40000 Salvador, Bahia, Brazil²

Received 1 May 1985/Accepted 28 June 1985

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of proteins and externally exposed labeled surface constituents were analyzed in promastigotes of three etiological agents of kala azar (*Leishmania donovani*, HS70 strain from India; *L. chagasi*, Imperatriz strain from Brazil; *L. infantum*, ITMPA K263 strain from Morocco and MO strain from France). Coomassie blue-stained gels showed similar protein patterns for *L. donovani* and *L. chagasi* and a more distinct one for *L. infantum*. Surface radioiodination with two different methods, lactoperoxidase and IODO-GEN, gave identical autoradiographic patterns for each parasite. Four major labeled proteins with apparent M_r values of 65,000, 60,000, 50,000, and 26,000 were detected in both *L. chagasi* and *L. donovani*. However, the radioiodinated polypeptide pattern of *L. infantum* only showed two major bands with an apparent M_r of 62,000 and a doublet of 26,000 to 23,000. Immunoprecipitation of detergent extracts of labeled promastigote subspecies with immune sera from rabbits immunized with either *L. chagasi* or *L. infantum* and from patients and mice infected with these two parasites, as well as with a monoclonal antibody against the surface of *L. donovani* promastigotes, demonstrated that the surface antigenic expression of *L. infantum* is different from that noticed in the two other subspecies, which are similar. Immunofluorescence experiments with some of these antibodies confirmed these results. The present findings should be considered in taxonomic and immunological studies in visceral leishmaniasis.

Parasites from the genus *Leishmania* are protozoan hemoflagellates which cause a wide range of disease states in animals and humans in many parts of the world. The life cycle of the *Leishmania* parasite involves an extracellular motile promastigote in the sand fly vector and an intracellular nonmotile amastigote within the mononuclear phagocytes of their vertebrate host. In cell-free culture medium, at 26 to 28°C, the parasites grow and multiply in a similar promastigote form (3) which remains infective when injected into susceptible hosts (12).

In humans, parasites from the *Leishmania donovani* complex cause visceral leishmaniasis or kala azar (24). The classic kala azar of Indian type, due to *L. donovani*, especially affects adults and induces post-kala azar dermal lesions. In Africa, *L. donovani* also infects adults but frequently presents a high resistance to antimonial treatment. Mediterranean kala azar by *L. infantum* especially affects children, and South American visceral leishmaniasis caused by *L. chagasi* is a disease of both adults and children. These geographical and clinical data have been used in the past to classify the organisms causing the visceral disease. Furthermore, immunological (19, 20, 22) and biochemical (1, 4, 15; P. Desjeux, F. LePont, S. Mollinedo, and M. Tibayrenc, Ann. Parasitol, in press) methods have proved to be particularly useful in the taxonomic classification of *Leishmania* spp. Attempts to correlate these biological characteristics and the different clinical and epidemiological manifestations of the various species of these parasites have led to numerous classification schemes (3).

Recently, the analysis of surface antigens with either polyvalent antisera or monoclonal antibodies (mAb) has been used to differentiate species, subspecies, and strains of

Leishmania (9, 19, 20). Moreover, these immunological reagents have also shown that different leishmanial stocks present several common or cross-reactive antigens (8, 9). In a preliminary investigation on the surface antigen profiles of promastigotes from an *L. donovani* complex isolated in Brazil and Africa, no difference has been observed (17). In addition, a glycoprotein of 65,000 molecular weight, recognized by human immune sera from different geographical areas, was the main component in both subspecies (17). More recently, this glycoprotein has been found as the major promastigote surface antigen of different stocks of *Leishmania* spp. (8). In the present study, we report the comparative analysis of surface polypeptides and antigenic components, immunoprecipitated with both polyvalent antisera and mAb, of the three main etiological agents of visceral leishmaniasis (*L. donovani*, *L. chagasi*, and *L. infantum*).

MATERIALS AND METHODS

Parasite strains and culture. Promastigotes from *L. donovani* (HS70 strain from India), *L. infantum* (ITMPA K263 strain from Morocco and MO strain from South of France), and *L. chagasi* (Imperatriz strain from Brazil) were cultured at 26°C in a cellular monophasic GLSH medium (18) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum.

Polyclonal antisera. Rabbit antisera to *L. infantum* (ITMPA K263 strain) and *L. chagasi* were obtained in New Zealand White rabbits by repeated subcutaneous injections of 2 mg of the total soluble extract of culture promastigotes in complete Freund adjuvant as previously described (18). Preimmunization sera from the same rabbits were used as controls. Sera of BALB/c mice inoculated intraperitoneally with 2.5×10^7 viable promastigotes of either *L. infantum* (ITMPA K263 strain) or *L. chagasi* were also used. Normal

* Corresponding author.

mouse serum was used as a control. All of these sera were aliquoted and stored at -20°C before use.

Human immune sera. Immune sera from five Mediterranean patients with *L. infantum* kala azar were generously provided by D. Le Ray (Tropical Medicine Institute, Anvers, Belgium). Sera from five Brazilian patients with visceral leishmaniasis and a positive serology for *L. chagasi* and from normal European subjects were also used.

Hybridoma production and mAb. mAb against the surface of both *L. chagasi* and *L. donovani* 3-day-old promastigotes were generated by the method of Köhler and Milstein (14). Briefly, spleen cells from BALB/c mice injected once intraperitoneally and thrice subcutaneously at 1-week intervals with 0.1% glutaraldehyde-fixed promastigotes (10^7) and boosted intravenously 3 days before fusion with 10^6 fixed parasites were fused with SP2/0 myeloma cells (23) in the presence of polyethylene glycol-dimethyl sulfoxide (7). Antibody production was assessed by indirect immunofluorescence (IF) and radioimmunoassay, using glutaraldehyde-fixed promastigotes (9). Positive hybrid cell lines were cloned twice by limiting dilution and ascitic fluids were produced in Pristane-primed BALB/c mice. Two particular mAb were used in this investigation: one produced against *L. chagasi* (IIIB1/5.9.12) and another produced against *L. donovani* (VH1/19.2.6). Both were immunoglobulin M (IgM) isotypes as determined by double diffusion in agar gels.

IF. IF was carried out with 0.1% glutaraldehyde-fixed promastigotes of the *L. donovani* complex coated on IF slides (Institut Pasteur, Paris, France). These slides were air dried and kept at -20°C until used. Diluted mice antisera or mAb were applied to the slides for 30 min at 37°C . After two washes by immersion in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3; the slides were incubated for 30 min with fluorescein-conjugated goat IgG anti-mouse immunoglobulin (IgG plus IgM plus IgA), heavy and light chain specific (Cappel Laboratories, Cochranville, Pa.), diluted 1:80 in PBS containing 0.01% Evans blue.

Surface radiolabeling with ^{125}I . Promastigotes of all *Leishmania* stocks were collected in their logarithmic growth phase (3-day-old culture) by centrifugation at $600 \times g$ for 10 min at 4°C . The pellets were suspended and washed three times in Hanks balanced salt solution containing 100 U of aprotinin (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) per ml and once in PBS. Lactoperoxidase-catalyzed radioiodination was performed essentially as previously described (5). Briefly, 5 μg of lactoperoxidase (Sigma), 0.5 mCi of Na^{125}I (Radiochemical Centre, Amersham, U.K.), and 5 μl of 0.01% (wt/vol) hydrogen peroxide were added sequentially to 10^8 parasites in 500 μl of PBS. After an incubation of 15 min in ice, the labeled promastigotes were washed three times by centrifugation ($600 \times g$, 10 min, 4°C) with 1 ml of ice-cold PBS containing 1 mg of NaI per ml.

For IODO-GEN-mediated labeling, a modification of the method described by Howard et al. (11) was used. Briefly, 1 mg of IODO-GEN (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.) was dissolved in 10 ml of chloroform, and 625 μl of this solution was transferred to 5-ml glass tubes. The solvent was evaporated under a stream of N_2 , leaving a coating of IODO-GEN bound to the tube. Subsequently, 10^8 promastigotes, washed as described above, in 500 μl of PBS and 0.5 mCi of Na^{125}I (5 μl) were added to the glass tube containing dried IODO-GEN. After a 10-min contact in ice, this mixture was transferred to a 1.5-ml Microfuge (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, Calif.) tube, and 1 ml of 10 mM NaI in PBS was added to the labeled parasites to quench the reaction. Final washes were as described above. After both radio-

iodinations, >95% of the promastigotes remained viable and actively motile and therefore were assumed to have retained intact surface membranes.

Solubilization of promastigotes. Labeled or unlabeled promastigotes were solubilized in a lysis buffer containing 10 mM Tris, 0.5% Nonidet P-40 (Bethesda Research Laboratories, Bethesda, Md.), and 100 U of aprotinin per ml and left overnight on agitation at 4°C . Detergent extract was then centrifuged at $5,000 \times g$ for 20 min at 4°C to remove cell debris, and the supernatant was used.

Immunoprecipitation. Immunoprecipitation was carried out in 1.5-ml Microfuge tubes by the method of Kessler (13), in which 40 μl of detergent extract of labeled promastigotes was diluted in 500 μl of 10 mM Tris-150 mM NaCl-2 mM EDTA-0.5% Nonidet P-40-100 U of aprotinin per ml and incubated with 10 μl of immune or normal serum (rabbit, mouse, or human) for 3 h at room temperature with constant agitation. Immune complexes were adsorbed with a 10% (vol/vol) suspension of protein A-Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Sweden) by rocking overnight at 4°C . For immunoprecipitation with mAb, 5 μl of ascites was added to the precleared leishmanial extract and the complexes were adsorbed with a suspension of protein A-Sepharose 4B previously incubated with a rabbit antiserum against mouse IgM, μ chain specific (Bionetics, Kensington, Md.). Adsorbed antigens were eluted by suspending washed Sepharose pellets in sodium dodecyl sulfate (SDS)-containing slab gel buffer (5) with 20% β -mercaptoethanol and boiled for 3 min. After centrifugation, the cleared supernatants were stored at -20°C for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

SDS-PAGE and autoradiography. SDS-PAGE of the immunoprecipitates was carried out in slabs, using a 10% polyacrylamide gel as previously described (16). Coomassie blue-stained gels were dried under vacuum. Labeled antigens were identified after autoradiography of the dried gels at -70°C , using Kodak X-Omat RP film (Eastman Kodak Co., Rochester, N.Y.) and Cronex intensifying screens (Du Pont de Nemours, Orsay, France).

RESULTS

Polypeptide profiles of promastigotes of *L. donovani*, *L. chagasi*, and *L. infantum*. Under reducing conditions, up to 40 polypeptide bands with molecular weights (M_r) ranging from 14,000 to 130,000 could be clearly distinguished by Coomassie blue staining of the SDS-PAGE analysis of the three subspecies detergent extracts (Fig. 1). The polypeptide profile observed for each parasite was reproducible in experiments performed over a period of several months. Protein patterns of *L. donovani* and *L. chagasi* appeared qualitatively similar (Fig. 1, lanes D and C). A minimum of 36 polypeptide chains were found to migrate with the same mobility. However, the protein pattern of *L. infantum* was clearly different from those of the other two (Fig. 1, lane I). It showed only 45 and 38% homology with the polypeptide profiles of *L. donovani* and *L. chagasi*, respectively.

Surface radioiodinated proteins of *L. donovani*, *L. chagasi*, and *L. infantum*. The specificity of both lactoperoxidase- and IODO-GEN-mediated labeling procedures for cell surface membranes has been demonstrated previously (8, 17). The autoradiographic patterns resulting from SDS-PAGE of the surface promastigotes of the three leishmania stocks, labeled by these two methods, are indicated in Fig. 2. A similar electrophoretic pattern was observed for each subspecies radiolabeled with both the lactoperoxidase and the IODO-GEN procedures. Nevertheless, the labeling yield with IODO-GEN was greater than that with lactoperoxidase (data

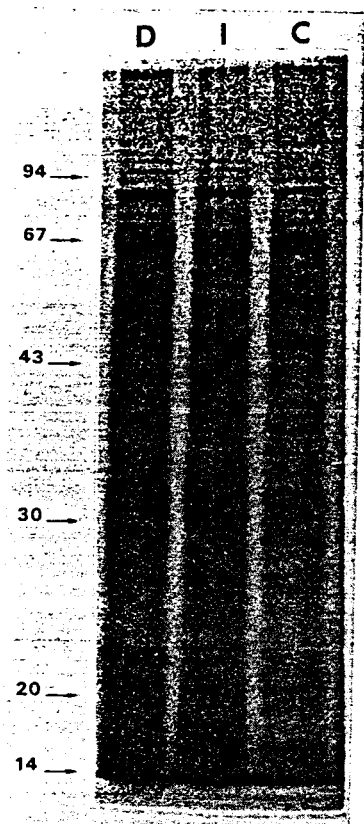


FIG. 1. Coomassie blue-stained patterns of promastigotes of *L. donovani* (lane D), *L. infantum* (lane I), and *L. chagasi* (lane C) separated by SDS-PAGE. The position of migration of marker proteins ($M_r \times 10^{-3}$) are indicated.

not shown). For this reason, in subsequent experiments all parasites were surface labeled by the IODO-GEN method.

In Fig. 2 (lanes d and c) one can also notice that the patterns of ^{125}I -labeled surface proteins of promastigotes of *L. donovani* and *L. chagasi* are almost identical. Four major bands with apparent M_r of 65,000, 60,000, 50,000, and 26,000 were detected in both parasites. A small variation was sometimes observed in the mobility of the 50,000 and 26,000 M_r polypeptides. The protein profile of radioiodinated surface promastigotes of *L. infantum* was different from those of the other two and only showed two major labeled bands with apparent M_r of 62,000 and a doublet of 26,000 to 23,000 (Fig. 2, lane i). Only the 26,000 M_r labeled component seemed to be common to all three leishmanial subspecies. The labeled surface protein pattern of promastigotes of another strain of *L. infantum* (MO strain) was identical to that of the ITMPA K263 strain (data not shown).

Identification of *L. donovani* subspecies-specific antigens by immunoprecipitation. Precipitates of Nonidet P-40 extracts of ^{125}I -surface-labeled promastigotes of *L. donovani*, *L. chagasi*, and *L. infantum* with rabbit antisera against either *L. chagasi* or *L. infantum* were analyzed in Fig. 3 (lanes J to O). The autoradiographic pattern obtained with *L. donovani* showed that the 65,000, 60,000, and 50,000 M_r proteins were strongly recognized by both rabbit antisera (Fig. 3, lanes J and M). Similar results were observed with *L. chagasi*, which showed an additional band of 43,000 M_r (lanes K and N). With the extract of *L. infantum*, both rabbit antisera precipitated only a major diffused band of 62,000 M_r (lanes L

and O). Control precipitations with normal rabbit serum showed a minor nonspecific band in different leishmanial extracts (Fig. 3, lanes d, e, and f).

Immune sera from mice injected with viable promastigotes of either *L. chagasi* or *L. infantum* were also used to precipitate labeled extracts of the different *L. donovani* subspecies. Sera against *L. chagasi* revealed on both *L. chagasi* and *L. donovani* a single major protein of 50,000 M_r (Fig. 3, lanes A, B, D, and E). As noted above, the relative electrophoretic mobility of this band exhibited little variation with *L. donovani*. Nevertheless, the same sera revealed in *L. infantum* two other proteins of 43,000 and 34,000 M_r (Fig. 3, lane F). Mouse immune serum against *L. infantum* precipitated four radioiodinated surface antigens of 43,000, 38,000, 34,000, and 25,000 M_r in the homologous subspecies but failed to recognize the labeled surface proteins of *L. chagasi* and *L. donovani* (Fig. 3, lanes G to I). No radiolabeled proteins were precipitated by normal mouse serum in the different promastigote extracts (Fig. 3, lanes a, b, and c).

Immunoprecipitation of the three leishmanial stocks with human immune sera are also illustrated in Fig. 3 (lanes P to

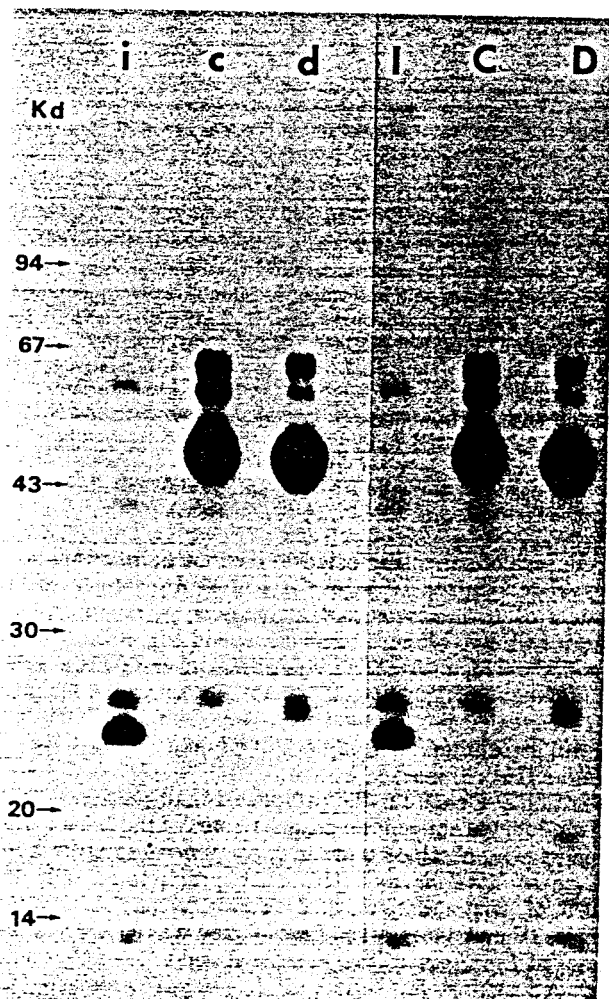


FIG. 2. Autoradiographic patterns of IODO-GEN-mediated ^{125}I -labeled *L. infantum* (lane i), *L. chagasi* (lane c), and *L. donovani* (lane d) promastigotes and respective lactoperoxidase-mediated ^{125}I -radiolabeled promastigotes (lanes I, C, and D) separated by SDS-PAGE. The molecular weights of marker proteins ($M_r \times 10^{-3}$) are indicated.

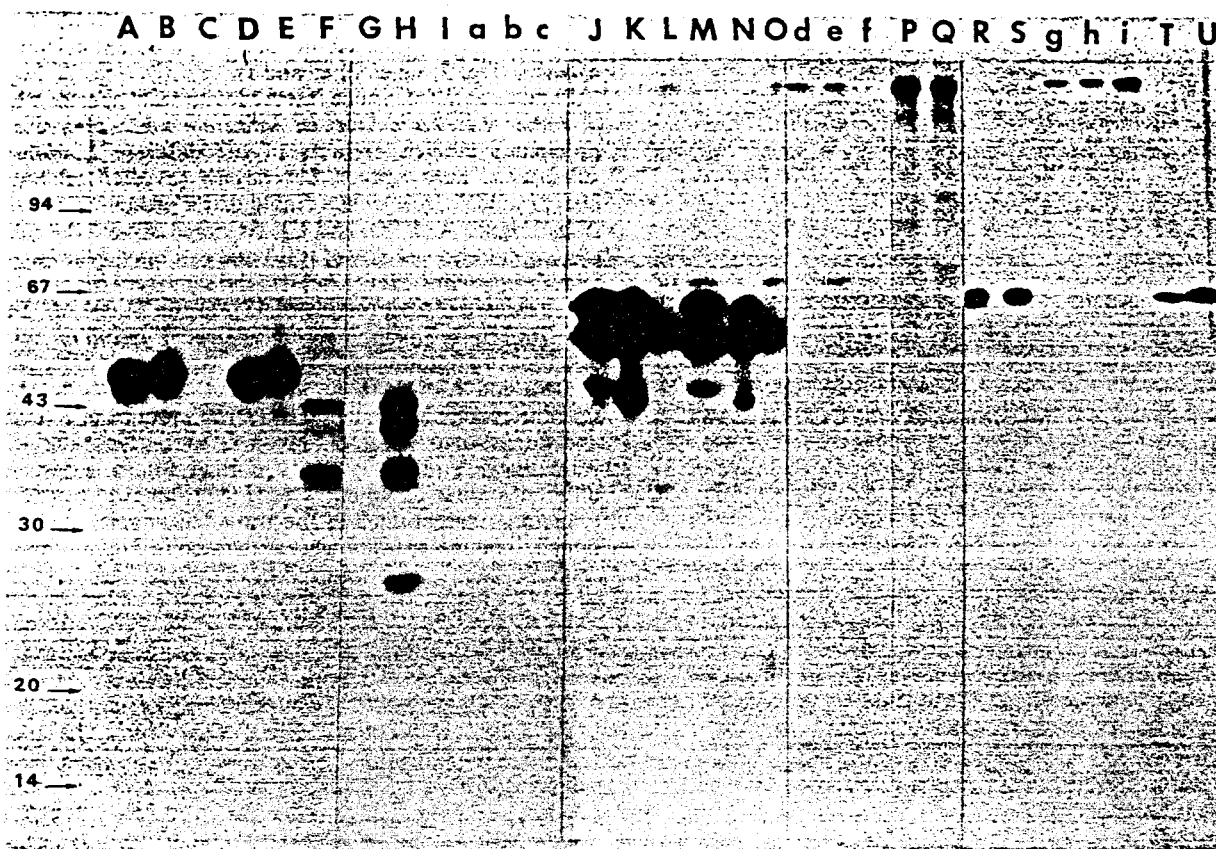


FIG. 3. Autoradiographic pattern of ^{125}I -labeled promastigote surface components precipitated from Nonidet P-40 extracts of different *L. donovani* subspecies with polyvalent immune sera after separation on SDS-PAGE. Precipitation with sera of mice infected after 43 days with *L. chagasi*: lane A, *L. donovani*; lane B, *L. chagasi*; lane C, *L. infantum*. Precipitation with sera of mice infected after 67 days with *L. chagasi*: lane D, *L. donovani*; lane E, *L. chagasi*; lane F, *L. infantum*. Precipitation with sera of mice infected after 67 days with *L. infantum*: lane G, *L. donovani*; lane H, *L. infantum*; lane I, *L. chagasi*. Precipitation with sera of a rabbit hyperimmunized with an antigenic extract of *L. chagasi*: lane J, *L. donovani*; lane K, *L. chagasi*; lane L, *L. infantum*. Precipitation with sera of a rabbit hyperimmunized with an antigenic extract of *L. infantum*: lane M, *L. donovani*; lane N, *L. chagasi*; lane O, *L. infantum*. Precipitation with sera of a patient infected with *L. chagasi*: lane P, *L. infantum*; lane R, *L. donovani*; lane T, *L. chagasi*. Precipitation with sera of a patient infected with *L. infantum*: lane Q, *L. infantum*; lane S, *L. donovani*; lane U, *L. chagasi*. Control precipitations of *L. donovani*, *L. chagasi*, and *L. infantum* with normal mouse (lanes a, b, c), rabbit (lanes d, e, f), and human (lanes g, h, i) sera, respectively.

U). All sera of patients infected with either *L. infantum* or *L. chagasi* recognized strongly the 65,000 M_r antigen in the extracts of *L. donovani* and *L. chagasi*. A demonstrative pattern with two of these sera is shown in Fig. 3 (lanes R, S, T, and U). This major band was absent in the pattern of *L. infantum* extract precipitated with the same human sera which revealed few minor bands (Fig. 3, lanes P and Q). Control precipitations with normal human sera were all negative (Fig. 3, lanes g, h, and i).

Further evidence for the presence of subspecies-specific surface-labeled antigens on promastigotes of the *L. donovani* complex was obtained with an mAb generated against the surface of *L. donovani*. This mAb precipitated only the 65,000 M_r major antigen of *L. donovani* and *L. chagasi* extracts (Fig. 4, lanes A and D). No band was revealed in the lysates of *L. infantum* (Fig. 4, lanes B and C). Another mAb produced against the surface of *L. chagasi* promastigotes precipitated a minor labeled antigen of 70,000 M_r in all subspecies studied (data not shown). Apparently minor nonspecific precipitation with an unrelated mAb occurred only in *L. chagasi* extract (Fig. 4, lanes a, b, c, and d).

Detection of subspecies-specific surface antigens by immunofluorescence. An additional experiment was performed to

evaluate by a classical immunological method the surface antigenic differences between *L. infantum* and the other two subspecies from the *L. donovani* complex. For this, polyvalent mouse antisera against glutaraldehyde-fixed promastigotes of *L. chagasi*, *L. infantum*, and *L. donovani* and mAb anti-*L. donovani* were allowed to react with the surface of the three leishmanial stocks by immunofluorescence (Table 1). Polyclonal immune sera against either *L. donovani* or *L. chagasi* presented a good cross-reactivity but failed to react efficiently with promastigotes of *L. infantum*. Furthermore, mouse antisera to *L. infantum* reacted only with the homologous surface. Finally, the mAb against *L. donovani* only recognized the surfaces of *L. donovani* and *L. chagasi*.

DISCUSSION

The present results demonstrate that the surface proteins of promastigotes of *L. infantum* are different from those of the two other subspecies of the *L. donovani* complex, *L. chagasi* and *L. donovani*, which are very similar. This finding was obtained by different technical approaches to protein analysis.

Coomassie blue staining after SDS-PAGE allowed the identification of the predominant proteins present in deter-

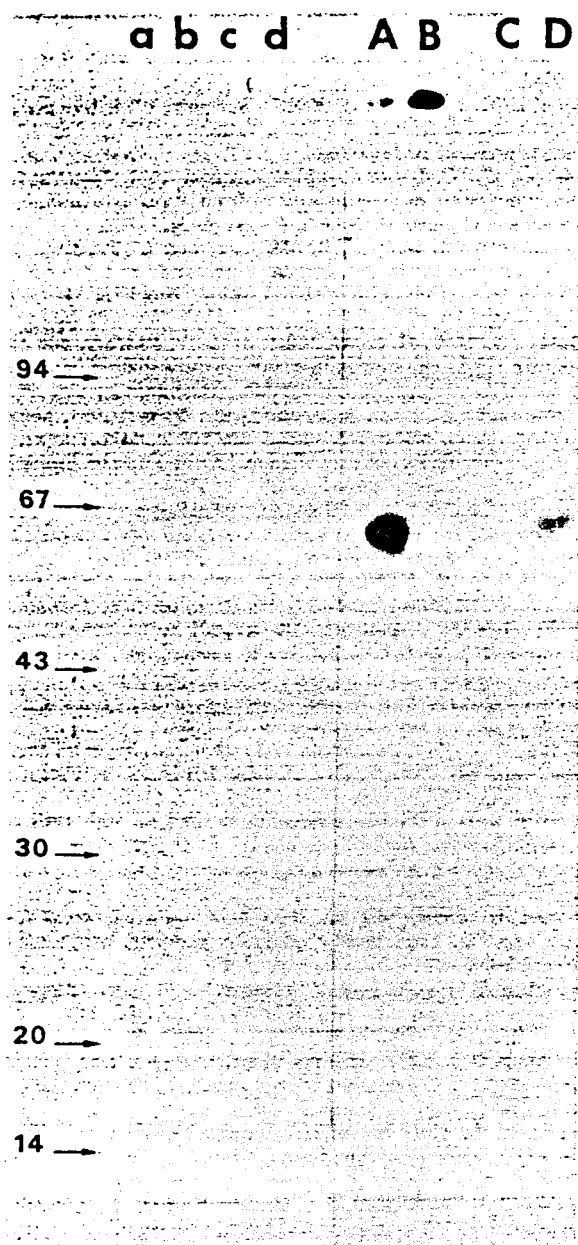


FIG. 4. Autoradiographic patterns of ^{125}I -labeled promastigote surface extracts precipitated with an unrelated mAb (small letters) or with the mAb produced against *L. donovani* (capital letters) after separation by SDS-PAGE. Lane A, *L. donovani*; lane B, *L. infantum* (ITMPA K263 strain); lane C, *L. infantum* (MO strain); lane D, *L. chagasi*.

gent extracts of the parasites. Although these polypeptide chains represent only a small fraction of the total number of promastigote proteins, their electrophoretic analysis already showed homologies between *L. chagasi* and *L. donovani* and strong differences between *L. infantum* and the two others. These preliminary data were further confirmed by analysis of surface-radiolabeled proteins of the three leishmanial subspecies. In fact, by using two different methods of radioiodination (lactoperoxidase and IODO-GEN) which gave identical profiles for each parasite (Fig. 2), the electrophoretic patterns of surface-labeled proteins of *L. donovani*

and *L. chagasi* were closely similar and different from those of *L. infantum*. Analysis of both proteins and surface proteins has been previously used to differentiate not only species (9) but also strains of *Leishmania* (9, 10, 21).

The surface polypeptide patterns presented by *L. chagasi* and *L. donovani* were qualitatively similar to those reported by others with *L. donovani* strains from Africa and Brazil (17, 21). Only the doublet of lower M_r , showed previously in different *L. donovani* strains (17) and here in *L. infantum*, was not completely exhibited by *L. chagasi* and *L. donovani*. In our study, only a band with 26,000 M_r was revealed, which could be common to all subspecies of *L. donovani*. Although similarities in M_r cannot be considered as definitive proof of structural identity, the great homology observed between the patterns of *L. chagasi* and *L. donovani* suggests structural relationships among their proteins.

Immunoprecipitation experiments with polyvalent antisera and mAb also showed surface antigenic homologies between *L. chagasi* and *L. donovani* and differences with *L. infantum*. Major cross-reactivities were noticed with immune sera of rabbits hyperimmunized with either *L. infantum* or *L. chagasi*. Both antisera precipitated the same proteins in *L. chagasi* and *L. donovani* and the 62,000 M_r protein of *L. infantum*. This was probably because these rabbits, which received different subcutaneous injections of the total aqueous extract of promastigotes for several weeks before bleeding, presented an immune response no longer restricted to the epitopes exposed on the external surface membrane but including also those exposed on the internal face. When immune sera from both patients and mice infected with either *L. chagasi* or *L. infantum* were used to precipitate the three labeled subspecies of *Leishmania*, the surface antigenic differences between *L. infantum* and the two others were accentuated and only a few cross-reactions were observed. Moreover, an mAb directed against the 65,000 M_r surface protein of *L. donovani* recognized the same molecule on *L. chagasi* but failed to react with *L. infantum*. The possibility of a similar 65,000 M_r surface antigen in *L. infantum* being inaccessible for labeling with ^{125}I was excluded by the immunofluorescence experiments with mouse polyvalent antisera and mAb, which confirmed the surface antigenic relationships between the promastigotes of *L. donovani* and *L. chagasi* and the differences from those of *L. infantum*.

The surface-labeled promastigote antigens precipitated by sera of patients with kala azar were different from those

TABLE 1. Detection of subspecies-specific surface antigens in promastigotes of the *L. donovani* complex by IF, using polyclonal antibodies and mAb

Mouse antibodies against promastigotes	IF titer ^a		
	<i>L. chagasi</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i> ITMPA K263
Polyclonal antisera to			
<i>L. chagasi</i>	1,280	640	40
<i>L. donovani</i>	640	640	80
<i>L. infantum</i>	(-) ^b	(-)	640
Monoclonal ascites to			
<i>L. donovani</i>	640	640	(-)

^a Values represent the reciprocal titer of the last dilution giving a positive fluorescence.

^b No positive reaction was observed at a 1:40 dilution.

revealed with sera of mice inoculated with viable promastigotes. It seems that the major antigenic molecule recognized by human antibodies in both *L. chagasi* and *L. donovani* (especially the 65,000 M_r one) is not immunogenic during murine infection and inversely with the 50,000 M_r antigen. This could be related to the susceptibility of these hosts to infection. In fact, the mouse is not an adequate model for visceral leishmaniasis. It is noteworthy that our mAb obtained from mice immunized with fixed promastigotes of *L. donovani* revealed, as did the sera from humans, the 65,000 M_r band.

In previous studies the 65,000 M_r antigen has been shown to be a glycoprotein (17) common to several species of *Leishmania* (8). More recently, Etges et al. (6) found a 65,000 M_r surface antigen in promastigotes from an *L. donovani* stock isolated in France (probably *L. infantum*) which should correspond to the 62,000 M_r antigen presently detected in two strains of *L. infantum*. Furthermore, it has been demonstrated that this protein is structurally related to a 63,000 M_r antigen of *L. major* but different from a component of similar M_r present in *L. tropica* (5). It seems clear that most *Leishmania* species have a major surface-labeled antigen of 62,000 to 65,000 M_r which expresses different levels of antigenic and structural relationships.

Using biochemical methods such as electrophoretic isoenzyme patterns (1, 15) and DNA buoyant density (4), several authors suggested that *L. chagasi* is more related to *L. infantum* than to *L. donovani*. In addition, Desjeux et al. (P. Desjeux, F. Le Pont, S. Mollinedo, and M. Tibayrenc, Ann. Parasitol, in press), investigating 13 isoenzyme patterns of the three *Leishmania* stocks studied here, also noticed a close homology between *L. infantum* and *L. chagasi* versus *L. donovani*. Nevertheless, the present results clearly demonstrate that *L. infantum* is different from the other two subspecies of the *L. donovani* complex as far as surface proteins are concerned. These findings indicate that the results obtained from isoenzyme investigations and from surface antigen studies are different. Both data are complementary and should be further considered in the taxonomy of *Leishmania*.

Finally, that the major surface antigens of *L. infantum* are different from those of *L. chagasi* and *L. donovani* can be related to previous studies suggesting that only species-specific antigens are involved in protective immunity against leishmaniasis (2). These findings imply a correct identification of subspecies-specific immunogens of most *Leishmania* species for immunization purposes.

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 indebted to J. A. Rioux who generously provided the MO strain of *L. infantum*, to D. Le Ray who provided rabbit and human immune sera against *L. infantum*, and to Q. Z. Husain, who provided the HS70 strain of *L. donovani*. We also are thankful for the expert technical assistance of Marc Loyens, Didier Deslee, and Vera Vidal and the secretarial help of Claudine Colson and Marie-France Massard.

LITERATURE CITED

- Aljebori, T. T. 1980. *Leishmania* spp. in Iraq. Electrophoretic isoenzyme patterns. I. Visceral leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74:169-177.
- Anderson, S., J. R. David, and D. McMahon-Pratt. 1983. *In vivo* protection against *Leishmania mexicana* mediated by monoclonal antibodies. J. Immunol. 131:1616-1618.
- Bray, R. S. 1974. *Leishmania*. Annu. Rev. Microbiol. 28:189-217.
- Chance, M. L., W. Peters, and L. Shchory. 1974. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. I. Observations on DNA. Ann. Trop. Med. Parasitol. 68:307-316.
- Dissous, C., C. Dissous, and A. Capron. 1981. Isolation and characterization of surface antigen from *Schistosoma mansoni* schistosomula. Mol. Biochem. Parasitol. 3:215-225.
- 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. 14:141-149.
- Galfre, G., S. C. Howe, C. Milstein, C. W. Butcher, and J. C. Howard. 1977. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. Nature (London) 226:250-252.
- Gardiner, P. R., C. L. Jaffe, and D. M. Dwyer. 1984. Identification of cross-reactive promastigote cell surface antigens of some leishmanial stocks by ^{125}I labeling and immunoprecipitation. Infect. Immun. 43:637-643.
- Handman, E., and R. E. Hocking. 1982. Stage-specific, strain-specific, and cross-reactive antigens of *Leishmania* identified by monoclonal antibodies. Infect. Immun. 37:28-33.
- Handman, E., G. F. Mitchell, and J. W. Goding. 1981. Identification and characterization of protein antigens of *Leishmania tropica* isolates. J. Immunol. 126:508-512.
- Howard, R. J., D. C. Kaushal, and R. Carter. 1982. Radioiodination of parasite antigens with 1,3,4,6-tetrachloro-3 α , 6 α -diphenyl-glycoluril (IODOGEN): studies with zygotes of *Plasmodium gallinacium*. J. Protozool. 29:114-117.
- Keilhly, J. S. 1976. Infectivity of *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes for golden hamsters. J. Protozool. 23:244-245.
- Kessler, S. W. 1975. Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. J. Immunol. 115:1617-1624.
- Köhler, G., and C. Milstein. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature (London) 256:495-497.
- Kreutzer, R. D., and H. A. Christensen. 1980. Characterization of *Leishmania* species by isoenzyme electrophoresis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29:199-208.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature (London) 227:680-685.
- Lepay, D. A., N. Nogueira, and Z. Cohn. 1983. Surface antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. J. Exp. Med. 157:1562-1572.
- 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. Belge Méd. Trop. 53:31-41.
- McMahon-Pratt, D., E. Bennet, and J. R. David. 1982. Monoclonal antibodies that distinguish subspecies of *Leishmania braziliensis*. J. Immunol. 129:926-927.
- McMahon-Pratt, D., and J. R. David. 1981. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. Nature (London) 291:581-583.
- Ramasamy, R., H. Jamnadas, and M. J. Mutinga. 1981. Proteins and surface proteins of *Leishmania* promastigotes and their possible relevance to the characterization of strains. Int. J. Parasitol. 11:387-390.
- Schnur, L. F., A. Zuckerman, and C. L. Greenblatt. 1972. Leishmanial serotypes as distinguished by the gel diffusion of factors excreted *in vitro* and *in vivo*. Isr. J. Med. Sci. 8:932-942.
- Shulman, M., H. Nilde, and G. Köhler. 1978. A better cell-line for making hybridomas secreting specific antibodies. Nature (London) 276:269-272.
- Zuckerman, A., and R. Lainson. 1977. *Leishmania*, p. 57-133. In J. P. Kreier (ed.), Parasitic protozoa, vol. 1. Academic Press, Inc., New York.

Article 3

Corrélation entre l'infectivité des promastigotes de *Leishmania* et leur expression antigénique de surface.

Une infection "productive" des macrophages par les leishmanies comprend les étapes suivantes: attachement des promastigotes, pénétration, transformation en amastigotes, survie à l'intérieur des macrophages, multiplication des amastigotes et enfin réinfection des macrophages voisins.

Cette partie de notre travail a consisté à mettre des promastigotes de *L. donovani* et *L. chagasi*, provenant des différents jours de culture, en contact avec des macrophages afin d'étudier d'une part, l'infectivité globale des différentes populations et, d'autre part, de déterminer le rôle des antigènes de surface dans l'interaction de *Leishmania* avec les cellules hôtes. Pour cette étude, des macrophages péritonéaux de souris consanguines BALB/c, ensemencés sur des lamelles de verre dans des plaques de culture, sont infectés par des promastigotes provenant des différents jours de culture (1 à 7 jours). Les sérums de souris immunisées avec des promastigotes de différents stades de culture ont servi à l'étude des antigènes de surface des promastigotes en utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte. Les promastigotes récupérés du tube digestif des phlébotomes après 7 jours d'infection ont été également utilisés pour comparer leur expression antigénique avec ceux provenant de culture.

L'ensemble de ces travaux montre que l'infectivité des promastigotes de diverses espèces de *Leishmania* est en rapport avec leur stade évolutif en culture ; les promastigotes en phase stationnaire (5 jours) sont, en effet, beaucoup plus infectieux vis-à-vis des macrophages péritonéaux de souris BALB/C *in vitro* que ceux en phase exponentielle (3 jours). Par ailleurs, en utilisant des techniques radioimmunologiques et d'immunofluorescence indirecte avec des sérums de souris immunisées avec les formes de 3 jours ou 5 jours, nous avons démontré que l'expression antigénique de surface des promastigotes infectieux est différente de ceux non-infectieux. Les anticorps polyclonaux anti-promastigotes de 5 jours réagissent également avec les promastigotes obtenus à partir de l'insecte vecteur (Phlébotomes).

CONCLUSION

Ces résultats indiquent que de nouvelles molécules immunogènes apparaissent en même temps que les promastigotes deviennent infectieux. D'autre part, ils mettent en évidence des similitudes antigéniques entre les promastigotes de culture en phase stationnaire, et ceux des phlébotomes qui présentent la même infectivité. Ces nouveaux antigènes qui sont exprimés à la surface des promastigotes infectieux pourraient jouer un rôle important dans les interactions parasites-macrophages.

INFECTIVITY OF *LEISHMANIA* PROMASTIGOTES IS ASSOCIATED WITH SURFACE ANTIGENIC EXPRESSION

Farrukh S. RIZVI¹, Daniel AFCHAIN¹, Italo SHERLOCK², Moyses SADIGURSKY²,
André CAPRON¹ and Ferruccio SANTORO¹

¹Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM 167 – CNRS 624, Institut Pasteur, 59019 Lille Cédex, France and ²Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-UFBA, 40000 Salvador, Bahia, Brazil

(Received 6 June 1985)

(Modified version received 13 August 1985)

(Accepted 23 August 1985)

1. Summary

Differentiation between a non-infective and an infective *Leishmania* promastigote population was demonstrated. Promastigotes in the stationary phase (day 5) were found to be highly infective in vitro to BALB/c mouse peritoneal macrophages, compared with those of the logarithmic phase (day 3). The infective promastigotes showed surface antigenic determinants different from non-infective ones. Polyclonal anti-3 day and anti-5 day antibodies were bound specifically to the surface of corresponding promastigotes in both SRIA and IFAT; no strong cross-reactions were observed otherwise. Also, polyclonal anti-5 day but not anti-3 day antibodies recognized efficiently the antigenic molecules on the surface of late stage (day 7) sandfly promastigotes. This clearly indicates the appearance of new antigenic molecules on the surface of infective promastigote forms. Intracellular

multiplication of *Leishmania* was significantly inhibited by anti-5 day antibodies compared with anti-3 day antibodies. The presence of new surface molecules on late stage promastigotes may contribute to *Leishmania* infectivity.

2. Introduction

Leishmania spp., a digenetic trypanosomatid protozoan, is an obligate intracellular parasite of mononuclear phagocytes transmitted by phlebotomine sandflies. Visceral leishmaniasis or kala-azar caused by different *Leishmania* species (*L. chagasi*, *L. donovani* and *L. infantum*) is an important cause of mortality in several third world countries [1]. The parasite cycles between a flagellated promastigote stage in the insect vector and a non-flagellated intracellular amastigote stage parasitizing the mammalian phagocytic cells. Differentiation into amastigotes occurs after surface attachment and entry of promastigotes into mononuclear phagocytes. Within the cell, the parasite overcomes a formidable array of hostile activities with which macrophages (MØ) are equipped to kill ingested microbes [2]. As a similar promastigote form develops when parasites are cultured in cell-free medium [3], extensive studies have been done on *Leishmania*–macrophage interactions [4–8]. Most of the cellular events leading to intracellular parasitism are dependent on these interactions.

Key words: *Leishmania* – macrophage interactions – infectivity – surface antigenic expression – polyclonal antibodies.

Abbreviations: MØ, macrophage(s); GLSH, glucose lactalbumin serum hemoglobin; FCS, fetal calf serum; HEPES, *N*-2-hydroxyethyl-piperazine *N'*-2-ethanesulphonic acid; HBSS, Hanks' balanced salt solution; FCA, Freund's complete adjuvant; PBS, phosphate buffered saline; IFAT, indirect fluorescent antibody test; FITC, fluorescein isothiocyanate; SRIA, solid phase radioimmunoassay.

In sandflies, *Leishmania* organisms undergo certain morphological and presumably functional changes to become infective promastigotes [9]. Nevertheless, it has been suggested that only a proportion of the culture promastigotes, resembling "probosis forms", are capable of invading and surviving in the MØ [4]. Recently, a sequential development of *Leishmania* promastigote from a non-infective to an infective stage has been demonstrated in *L. tropica* growing in vitro and in the sandfly vector [10]. These findings raise the possibility that the development of the infective stage is associated with modifications and/or changes in antigenic expression on the surface of promastigotes. The present investigation was undertaken as a first step in this direction. In this communication we study the reactivities of anti-promastigote polyvalent immune sera against infective and non-infective stages of *L. chagasi*.

3. Materials and Methods

3.1. Parasites

Promastigotes of *L. chagasi* (MHOM/BR/81/IMPERATRIZ) and *L. donovani* (MHOM/IN/83/HS70) were cultivated in monophasic GLSH medium [11] supplemented with 10% (v/v) foetal calf serum (FCS) (Boehringer, Mannheim, F.R.G.) at 26 °C. At day 0, cultures were inoculated with 10^5 promastigotes \cdot ml⁻¹ in 50 ml medium and parasites were harvested at the end of day 3 and day 5 cultures. Sandfly promastigotes were obtained from the midgut of *Lutzomyia longipalpis* infected 7 days earlier with the Imperatriz strain of *Leishmania chagasi* as previously described [12]. The promastigotes were washed three times in Hanks' balanced salt solution (HBSS) supplemented with glucose before use.

3.2. Mice and peritoneal macrophages

BALB/c mice were bred in our animal facilities and used between 6 and 10 wk of age. Peritoneal MØ were harvested from the unstimulated peritoneal cavity by inoculating RPMI-1640

medium (GIBCO, Auckland, New Zealand) containing 10% (v/v) inactivated FCS, 5 U heparin/ml, 25 mM HEPES $pK_a = 7.5$ (SIGMA) and antibiotics (200 U/ml penicillin, 200 µg/ml streptomycin). Exudates from several mice were pooled, washed and the cells seeded on coverslips placed in 24-well culture plates. Approximately 2.5×10^5 cells were placed in each well in RPMI-1640 with 10% FCS (pH 7.3) and cultured at 37 °C with 5% CO₂ in air to allow MØ to settle on coverslips. After 4 h the non-adherent cells were washed away and wells were replaced with fresh medium.

3.3. *Leishmania*–macrophage interactions

The promastigotes harvested from 3-day (logarithmic phase) and 5-day (stationary phase)-old cultures were added to the wells containing MØ at a ratio of 20 promastigotes/cell and incubated at 37 °C in 5% CO₂. At various time intervals (30 min, 24 h and 48 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 were counted in 500 cells in duplicate, and after 4 h incubation remaining wells were washed gently to remove the non-adherent promastigotes. The number of infected MØ along with the number of amastigotes were counted at the end of 24 and 48 h incubation period. To study the inhibitory activity of polyvalent anti-sera, the promastigotes were incubated with different dilutions of either anti-3 or anti-5 day sera before invasion of the MØ.

3.4. Immunization

Two groups of BALB/c mice were immunized with either 3- or 5-day old *L. chagasi* promastigotes fixed with 0.1% glutaraldehyde and washed with 0.1 M glycine buffer in HBSS. On day 0, all mice were injected intraperitoneally with 10^7 promastigotes in Freund's complete adjuvant (FCA). On days 14, 21 and 28, the mice received subcutaneous injections of 10^7 fixed promastigotes with FCA. A separate group of mice received intradermal injections of fixed promastigotes from day 14 onward.

3.5. Indirect immunofluorescence antibody test (IFAT)

Three- and 5-day-old glutaraldehyde-fixed promastigotes were coated on IF slides (Institut Pasteur, Paris, France). The slides were air dried and serial dilutions of antisera were applied. After 30 min incubation at 37 °C the slides were washed with PBS (pH 7.3) and incubated for another 30 min in the presence of a 1:40 dilution of FITC-conjugated goat IgG anti-mouse Ig (IgG + IgM + IgA) that was heavy and light chain specific (CAPPEL, Cochranville, PA). After washing the slides were mounted in 50% buffered glycerol and examined under the fluorescent microscope.

3.6. Solid-phase radioimmunoassay (SRIA)

Reactivity of polyvalent antisera against *L. chagasi* promastigote surface antigens was also measured by SRIA [13] which has been adapted for *Leishmania* spp. by McMahon-Pratt and David [14]. Briefly, 10⁶ fixed promastigotes in 50 µl PBS (pH 7.3) were coated in each well of a 96-well polyvinyl chloride microtiter plate (Cooks Lab. Prod., Alexandria, VA). The plates were saturated with 2% BSA in PBS (SRIA buffer) for 60 min at room temperature. Promastigote-coated wells were reacted with 50 µl of serial dilutions of anti-3 day and anti-5 day sera for 60 min at room temperature, washed in SRIA buffer and incubated for an additional 60 min at room temperature with 50 µl of the goat IgG

anti-mouse Ig (CAPPEL, Cochranville, PA) labelled with ¹²⁵I. The plates were washed in SRIA buffer, air dried and the wells counted in a gamma counter.

4. Results

4.1. Promastigote-macrophage interactions

In our controlled cultures the promastigotes of *L. chagasi* and *L. donovani* remained in the active dividing phase (logarithmic) up to the 4th day and in the nondividing phase (stationary) for the 5th and 6th day. The promastigotes of day 3 and day 5 were selected for the present study.

Table 1 is a summary of results of *Leishmania*-macrophage interactions obtained with the promastigotes, procured from both log and stationary phases of in vitro cultures. An average 37% MØ showed the attachment of log phase promastigotes of *L. chagasi* at a ratio of 1:1. At the end of 24 h incubation, these promastigotes were seen to transform to amastigotes with 48% infection of MØ, but at the end of 48 h incubation there was no further increase in amastigotes. The total infection at this time remained almost constant. Most of the parasites were seen to be extracellular and degenerated. By contrast, promastigotes obtained on day 5 showed an increased adherence within 30 min of incubation. On subsequent incubation extensive transformation to amastigotes could be observed and the

Table 1
Leishmania-macrophage interactions in vitro in BALB/c mouse MØ at 37 °C

<i>Leishmania</i> species	Days in culture	% Attachment within 30 min	No. of promastigotes per 100 MØ	No. of amastigotes per 100 MØ at different time intervals ^a	
				24 h	48 h
<i>L. chagasi</i>	3	37	102	75 (48)	25 (39)
	5	77	363	514 (85)	633 (94)
<i>L. donovani</i>	3	20	79	30 (28)	50 (23)
	5	27	145	803 (88)	1740 (98)

^a Count of 1000 cells.

Numbers in parentheses indicate % MØ infected.

multiplication and reinfection at the end of 48 h was marked. Identical results were obtained in *L. donovani*-macrophage interactions.

4.2. Reactivity of polyvalent immune sera to promastigotes

The IFAT, using both log and stationary phase promastigotes as antigen models, indicated that polyvalent anti-sera reacted strongly with the surface of *L. chagasi* promastigotes in a homologous promastigote-antiserum system (Table 2). Bright fluorescence was observed up to a serum dilution of 1:320. Two anti-3 day sera from intradermal group of mice cross-reacted on the surface of day 5 promastigotes, but the fluorescence observed was discontinuous and irregular at a reciprocal titer of 1:80. However, anti-5 day promastigote sera failed to recognize the antigens on the surface of day 3 promastigotes.

The reactivity of the above sera was also evaluated in SRIA tests using promastigotes from in vitro cultures as well as from the sandfly vector. The level of reactivity was taken as a ratio of CPM bound in the presence of antibody to CPM bound by negative controls (Fig. 1). Anti-5 day sera reacted strongly with the promastigotes of sandfly origin, with an elevated ratio of CPM-bound antibody as compared to anti-3 day sera.

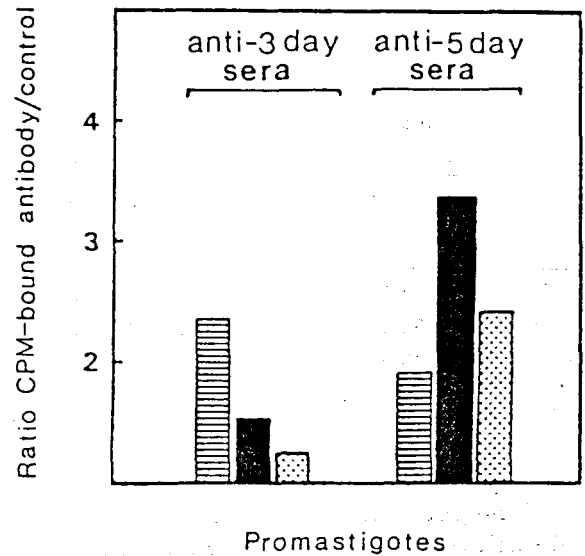


Fig. 1. Evaluation of the specificities of polyclonal antibodies in SRIA using glutaraldehyde fixed promastigotes of *L. chagasi* as antigen. ▨, Log phase promastigotes (day 3); ■, stationary phase promastigotes (day 5); ▩, late stage sandfly promastigotes.

4.3. Effect of polyvalent immune sera on intracellular survival of *Leishmania* in vitro

Table 3 summarizes the effects of polyvalent mouse antisera against the logarithmic and stationary phase promastigotes on in vitro attach-

Table 2
Surface antigenic specificities of logarithmic and stationary phase promastigotes of *L. chagasi* by means of IFAT

Route of immunization	Sera of mice	Reciprocal IFA titers with fixed promastigotes of	
		Logarithmic phase	Stationary phase
Subcutaneous	anti-3 day	320	40
	anti-5 day	40	640
Intradermal	anti-3 day	640	80*
	anti-5 day	40	640
Control		<40	<40

* Fluorescence sparse and irregular.

Table 3
Survival of *L. chagasi* treated with polyclonal mouse antisera against logarithmic and stationary phase promastigotes in mouse peritoneal macrophages in vitro

Antibody treatment	% Attachment within 30 min	No. of promastigotes per 100 MØ	No. of amastigotes per 100 MØ at different time intervals ^a	
			24 h	48 h
Anti-3 day serum	84	503	271 (84)	527 (76)
Anti-5 day serum	82	468	202 (44)	103 (45)
Normal mouse serum	85	338	1280 (72)	2349 (95)

^a Count of 1000 cells.

Numbers in parentheses indicate % MØ infected.

ment, uptake and intracellular survival of infective *L. chagasi* in normal BALB/c mouse peritoneal MØ. Neither anti-3 day nor anti-5 day sera were found to interfere with the attachment of promastigotes to MØ compared with the controls. The treatment of promastigotes with anti-3 day or anti-5 day sera partially abolished their capacity to multiply within the MØ in vitro. The inhibitory effect of anti-5 day serum on the multiplication of intracellular amastigotes was noticeable only at the end of 48 h incubation, when only 45% of cells exhibited morphologically intact amastigotes. At the same time, there was a considerable decrease in the number of intact intracellular amastigotes, with a concomitant increase of degenerate and extracellular parasites.

However, in MØ infected with anti-3 day serum-treated promastigotes there was an initial decrease in the number of intracellular amastigotes, but the parasites already internalized were seen to multiply at the end of 48 h incubation. Further, there was no marked alteration in the overall infection of MØ.

5. Discussion

In the present study we have demonstrated by IFAT and SRIA, using polyclonal antibodies, that surface antigenic expression of infective *Leishmania* promastigotes (stationary forms) is

different from that of noninfective (logarithmic forms) parasites.

A clear differentiation of a non-infective and an infective population was observed in promastigote cultures of *L. chagasi* and *L. donovani*. These results support those obtained with *L. tropica* [10]. Some promastigotes of the log phase were found to infect the MØ and develop into amastigotes (Table 1). This can be attributed to the passage of infective promastigotes to subcultures, and which would have neither multiplied nor died when the parasites were introduced to MØ. However, the multiplication of log phase promastigotes within the MØ and overall MØ infection at the end of 48 h incubation was not significant compared with stationary phase (day 5) promastigotes. The promastigote/MØ ratio in our experiments, selected to yield moderate infection, was found to be independent of the number of intracellular parasites, because the non-adherent promastigotes were washed off after 4 h incubation.

The in vitro development of infective forms seems to be similar to the developmental changes occurring during the growth of promastigotes in sandfly vector [9]. Inoculation of promastigotes from the sandfly has repeatedly been shown to initiate infection in susceptible hosts [9, 12, 15, 16]. There were, however, some reports

of failure to establish infections [9]. Moreover, several investigators have found a correlation between the age of *Leishmania* promastigotes in cultures and their infectivity for experimental animals [15]. The generation of an infective form with modified surface molecules in the sandfly suggests that the nutrient-depleted environment, resembling that of stationary cultures, exerts a selective pressure on the promastigotes, thereby giving rise to an infective form possibly resistant to enzyme degradation within the MØ. In fact, the labelled surface molecules of *Leishmania* parasites were shown to persist up to 36 h within the MØ without being digested [17].

In this study, we also attempted to show that modifications in antigenic expression may arise during the development of *Leishmania* promastigotes. Polyclonal antibodies against the promastigotes in the log and stationary phases bound specifically to the surface of their corresponding populations in both SRIA and IFAT. A weak positive reactivity was noticed between promastigotes of the stationary phase and some anti-3 day sera. This can be attributed to few common antigenic determinants shared by these two populations. In fact, during the sequential development, the promastigotes in the stationary phase could have retained certain antigens characteristic of log phase promastigotes. There was, however, no binding of fluorescent antibodies of anti-5 day sera to logarithmic phase promastigotes. This clearly indicates the appearance of new antigenic molecules on the surface of infective promastigote forms. The ability of anti-3 day and anti-5 day sera to recognize specifically their corresponding antigens was specially observed with mice immunized early (about 4 wk). This phenomenon was found to diminish when the same groups of mice were immunized for an extended period (data not shown), and strong cross-reactions were observed. It seems that major common antigens dominate only during late immune responses in BALB/c mice. Moreover, this suggests that antigenic determinants recognized by anti-3 day sera are not sufficiently immunogenic on the surface of stationary phase promastigotes during early 28 days of immunization.

Efficient binding of anti-5 day but not anti-3 day antibodies was found, too, on the surface of day 7 promastigotes obtained from the sandfly. This provides direct evidence for similarities of in vitro stationary phase and late stage (day 7) sandfly promastigotes both in their ability to infect macrophages and in their antigens. Also, it may be possible that anti-3 day sera would cross-react with early stage sandfly promastigotes.

The preliminary results on the capacity of polyclonal antisera to block the *Leishmania*-macrophage interactions provide indirect evidence for cell surface modifications during in vitro infective promastigote differentiation. The inhibitory effect of both anti-3 and anti-5 day sera seems to be due to the antibodies against antigenic determinants shared by both infective and non-infective promastigotes and are involved only in the primary interaction of parasites with host cells. In fact, anti-3 day serum treated promastigotes already transformed to amastigotes were seen to thrive and multiply in MØ over a 48 h incubation period. The inhibitory effect was more pronounced in MØ infected with anti-5 day serum-treated promastigotes. There was a considerable decrease both in the number of intracellular amastigotes and in the overall infection of MØ compared with anti-3 day serum. It can be argued that the dominance of infective stage-specific antibodies in anti-5 day sera largely contributes to the decrease in intracellular parasites and to the subsequent inhibition of reinfection as well. This variability in the extent of inhibitory activities of immune sera further supports the above findings of modification or appearance of new molecules on the surface of infective promastigotes that may be involved in the transformation and/or intracellular survival of *L. chagasi*.

However, neither anti-3 day nor anti-5 day sera were found to interfere with promastigote attachment to MØ within 30 min. This is because the attachment of particulate entities such as promastigotes and monocytes entails highly complex interactions, possibly involving electrostatic and hydrophobic forces [18]. As a result, antibodies may not be sufficient to mask the specific

ligands involved in the attachment process or to alter the cell surface in a non-specific manner.

In conclusion, promastigotes of *Leishmania* spp. develop into an infective stage both in cultures as well as in sandfly vectors. This phenomenon simultaneously gives rise to modifications in the expression of cell-surface antigens of the infective forms. Such modified antigenic expression may facilitate parasite adherence to, and penetration into, the macrophages and could contribute to the protection of leishmaniae in the hostile activities of host cells. The immediate implication of these findings is that this diversity will have to be taken into consideration when vaccines are developed against leishmanial infections. The development of specific antibodies against isolated new antigenic molecules from the surface of infective promastigotes will be a critical step in blocking *Leishmania*-MØ interactions, and such antibodies can be used as molecular markers to identify and characterize infective leishmanial forms.

Acknowledgements

We acknowledge the expert technical assistance of Didier Deslée, Marc Loyens and Vera Vidal, and the secretarial help of Claudine Colson and Marie-France Massard. This investigation received financial support from The Rockefeller Foundation, UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases and EEC (grant no. TSD-M-010-F (RS)).

References

- [1] Zuckerman, A. and Lainson, R. (1977) in: Parasitic Protozoa (J. P. Krier, Ed.), Vol. 1, pp. 57-133, Academic Press, New York.
- [2] Alexander, J. and Vickerman, K. (1975) *J. Protozool.* 22, 502.
- [3] Bray, R. S. (1974) *Ann. Rev. Microbiol.* 28, 189.
- [4] Bray, R. S. (1983) *J. Protozool.* 30, 314.
- [5] Chang, K. P. and Dwyer, D. M. (1975) *J. Parasitol.* 61 (Suppl.), 71.
- [6] Chang, K. P. and Dwyer, D. M. (1978) *J. Exp. Med.* 147, 513.
- [7] Chang, K. P. (1979) *Exp. Parasitol.* 48, 175.
- [8] Akiyama, H. J. and Haight, R. D. (1971) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 539.
- [9] Killick-Kendrick, R. (1979) in: *Biology of the Kinetoplastida* (W. H. R. Lumsden and D. A. Evans, Eds.) pp. 395-460, Academic Press, London.
- [10] Sacks, D. L. and Perkins, P. V. (1984) *Science* 223, 1417.
- [11] Jadin, J. B. and Pierreux, G. (1960) *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 40, 903.
- [12] Lainson, R., Ward, R. D. and Shaw, J. J. (1977) *Nature* 266, 628.
- [13] Stocker, J. W. and Heusser, C. H. (1979) *J. Immunol. Methods* 26, 87.
- [14] McMahon-Pratt, D. and David, J. R. (1981) *Nature (London)* 291, 581.
- [15] Adler, S. (1964) *Adv. Parasitol.* 2, 35.
- [16] Giannini, M. S. (1974) *J. Protozool.* 21, 521.
- [17] Chang, K. P. and Fong, D. (1983) in: *Cytopathology of Parasitic Diseases* (D. Evered and G. M. Collins, Eds.) pp. 113-137, Pitman Books, London.
- [18] Keush, G. T. (1982) in: *Current Topics in Inflammation and Infection* (G. Majno, R. S. Cotran and N. Kaufman, Eds.) pp. 98-113, The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Article 4

La modification de l'infectivité des promastigotes de *Leishmania* est associée à l'expression d'un antigène de surface de 65 kDa.

Le but de ce travail a été de mettre en évidence une modification de l'infectivité, vis-à-vis des macrophages péritonéaux de souris, des promastigotes de *L. chagasi* et *L. braziliensis* 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.

Pour cette étude, des macrophages péritonéaux de souris BALB/c ensemencés sur des lamelles de verre dans des plaques de culture sont infectés par des promastigotes provenant des différents jours de culture. L'étape d'attachement des promastigotes a été étudiée en observant après coloration les macrophages infectés pendant 30 minutes, après avoir éliminé par lavage les parasites non-adhérents. Dans tous les cas, une corrélation très significative a été mise en évidence entre l'âge des promastigotes en culture et leur infectivité vis-à-vis des macrophages.

Pour étudier le rôle des antigènes de surface, une batterie d'anticorps monoclonaux et polyclonaux a été produite vis-à-vis de la surface des promastigotes de diverses espèces de *Leishmania*. Par des techniques d'immunoprécipitation suivies d'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS, il a été constaté que les anticorps reconnaissaient une molécule de 65 et 63 kDa à la surface des promastigotes de *L. braziliensis* et *L. chagasi* respectivement.

Des expériences préliminaires d'immunofluorescence indirecte faisant réagir les promastigotes de *L. braziliensis* avec un anticorps monoclonal VD5/25 (de classe IgM), ont montré une augmentation de l'intensité de fluorescence avec les parasites de phase stationnaire par rapport à ceux de la phase de latence et exponentielle. La cytofluorométrie de flux a permis de confirmer ces résultats tout en montrant de façon quantitative cette modification de l'expression antigénique de surface des promastigotes de *L. braziliensis*.

Dans le cas de *L. chagasi* deux anticorps monoclonaux (VH1/19, de classe IgM et IIIID4/9, de classe IgG1k) ont été produits vis-à-vis des antigènes de surface des promastigotes provenant de la phase exponentielle et de la phase stationnaire respectivement. Un anticorps

VH1/19 a réagi vis-à-vis d'une molécule de 63 kDa présente à la surface des promastigotes de la phase exponentielle et de la phase stationnaire. Par contre l'anticorps IID4/9 produit contre les formes de la phase stationnaire a reconnu cette molécule spécifiquement à la surface des formes infectantes de la phase stationnaire. L'immunoprécipitation et l'analyse en bi-dimensionnelle en utilisant le gel de polyacrylamide-SDS ont montré qu'une nouvelle molécule apparaissait à la surface des formes infectantes et était reconnu par cet anticorps monoclonal. De plus, cet anticorps monoclonal a pu inhiber l'attachement des promastigotes de *L. chagasi* à la surface des macrophages *in vitro*.

CONCLUSION

Il apparaît en effet que pendant une courte période correspondant à la phase stationnaire des cultures parasitaires :

- les promastigotes présentent une infectivité maximum vis-à-vis des macrophages;
- l'infectivité de *Leishmania chagasi* est associée à l'apparition de néoantigènes de 63 kDa (gp63) à la surface des promastigotes;
- dans le modèle *L. braziliensis*, une corrélation très significative a été observée entre l'âge des promastigotes, leur infectivité et l'expression croissante d'au moins un épitope de surface reconnu par un anticorps monoclonal présent sur la gp63.

Les résultats montrant l'inhibition de l'infectivité, et notamment de la survie et de la multiplication intracellulaire par les anticorps monoclonaux, ont permis d'établir que cet antigène de différenciation joue un rôle fonctionnel au cours de l'infection des macrophages par les promastigotes.

INFECTIVITY OF LEISHMANIA PROMASTIGOTES IS DEPENDENT ON
THE EXPRESSION OF A 65,000 DALTON SURFACE ANTIGEN

F. SANTORO, M. KWEIDER, J.L. LEMESRE, F. DARCY and F.S. RIZVI

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte
INSERM 167 CNRS 624, Institut Pasteur, 1 Rue du Prof. Calmette,
59019 Lille Cédex, France

INTRODUCTION

Leishmania spp., a digenetic trypanosomatid protozoan, is an obligate intracellular parasite of mononuclear phagocytes transmitted by phlebotomine sandflies. The parasite cycles between a flagellated motile promastigote stage in the insect vector and a non-motile intracellular amastigote stage parasitizing the mammalian phagocytic cells. Differentiation into amastigote occurs after surface attachment and entry of promastigotes into mononuclear phagocytes.

A number of investigators have shown that promastigotes from the stationary phase culture were more infective than those from logarithmic phase both in vivo for experimental animals and in vitro for mouse peritoneal M ϕ (Giannini 1974, Keithly & Bienen 1981, Sacks & Perkins 1984, Rizvi et al. 1985). Also the late stage promastigotes obtained from infected sandflies were more infective in vivo & in vitro than the early stage forms. More recently, we and others (Rizvi et al. 1985, Sacks et al. 1985) have reported that the development of infective stage promastigotes is associated with changes in surface components.

To characterize the infective stage specific molecules and to evaluate their biological significance in promastigote-M ϕ interactions, several monoclonal antibodies (mAb) were generated against the surface components of the promastigotes of Leishmania braziliensis (MHOM/BR/00/LV65) and L. chagasi (MHOM/BR/81/IMPERATRIZ). Using these mAbs, we demonstrate that the development of the infective stage of Leishmania promastigotes is associated with modifications in antigenic expression on the promastigote surface.

RESULTS AND DISCUSSION

For the present study the promastigotes of *Leishmania* spp. were cultivated in a monophasic medium to obtain a more or less uniform population of the parasite at different points of their growth curve. In our controlled cultures the promastigote of *L. braziliensis* remained in the active dividing phase (logarithmic) up to the 5th day and in the non-dividing phase (stationary) for the 6th and 7th day (Fig. 1). However, the stationary phase of *L. chagasi* started a day earlier.

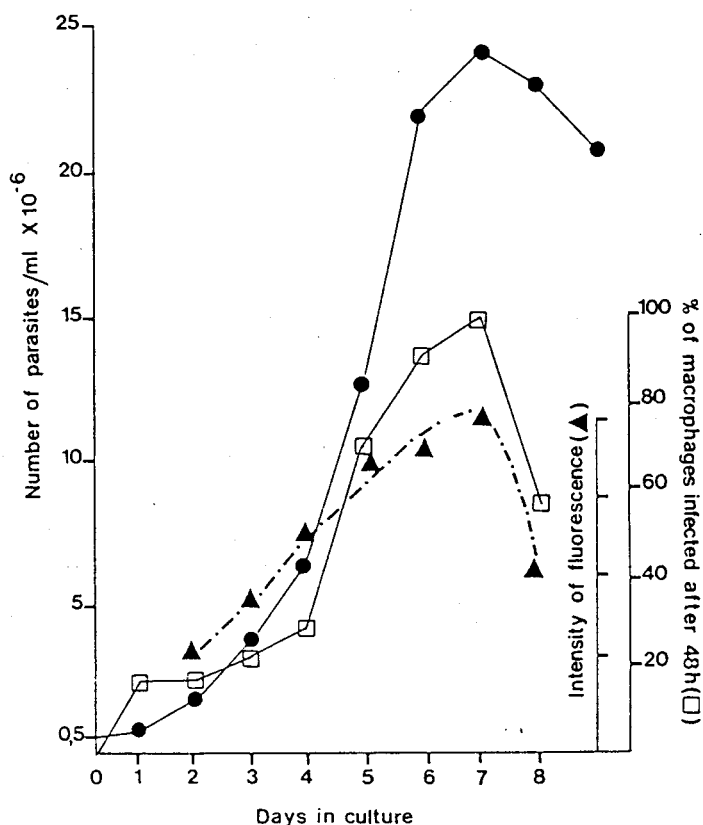


Figure 1. Comparison between the *in vitro* growth of *L. braziliensis* promastigotes (●—●), their infectivity towards mouse peritoneal MØ (□—□) and binding of mAb VD5/25 to the promastigote surface (▲—▲).

The sequential development of an infective promastigote population of *L. braziliensis* was also demonstrated *in vitro* (Fig. 1). As shown previously for other *Leishmania* spp. (Sacks & Perkins 1984, Rizvi *et al.* 1985), the generation of infective forms was related to the growth cycle and was restricted to the non-dividing promastigotes. The *in vitro* development of

infective forms seems to be similar to the changes occurring during the growth of promastigotes in sandfly vector (Sacks & Perkins 1984). Moreover, the generation of an infective form in the sandfly suggests that the nutrient-depleted environment, resembling that of stationary cultures, exerts a selective pressure on the promastigotes, thereby giving rise to an infective form possibly resistant to enzyme degradation within the MØ. In fact, the labelled surface molecules of Leishmania parasites were shown to persist up to 36h within the MØ without being digested (Chang & Fong 1983).

In order to evaluate the surface antigenic expression of the promastigotes obtained at different time of growth, a battery of mAbs was generated against the promastigotes of L. braziliensis and L. chagasi. Fusion of SP2/O myeloma cells with spleen cells from mice immunized with two different promastigote populations generated several hybridomas secreting two different isotypes (IgM & IgG1k) of mAbs to the surface antigens. An IgM mAb against L. braziliensis (VD5/25) bound to the surface of promastigotes in IFA tests and precipitated two molecules of apparent Mr 65,000 and 50,000 (GP65-50) from the lysates of the radio-iodinated promastigotes. The IFA titer of this mAb increased progressively as the promastigotes developed in culture and reached at maximum with stationary phase promastigotes. Another IgM mAb against the log phase L. chagasi (IIIB1/26), which cross reacts with L. braziliensis, showed the same IFA titer throughout the developmental cycle. The identical results were obtained by flow cytometric analysis. The peak fluorescence intensity was in the increasing order as the parasite matured and was always maximum with the infective form (Fig. 1). This antigenic differentiation was not detected with anti L. braziliensis polyclonal rabbit antisera suggesting that only a few epitopes, including that recognized by VD5/25, have their expression effectively increased on the surface of infective promastigotes. The intracellular survival of L. braziliensis was significantly inhibited when the infective promastigotes were treated with VD5/25 (Fig. 2). It appears, therefore, that the increasing expression of GP65 on the promastigote surface represents an essential mechanism of Leishmania survival within the MØ.

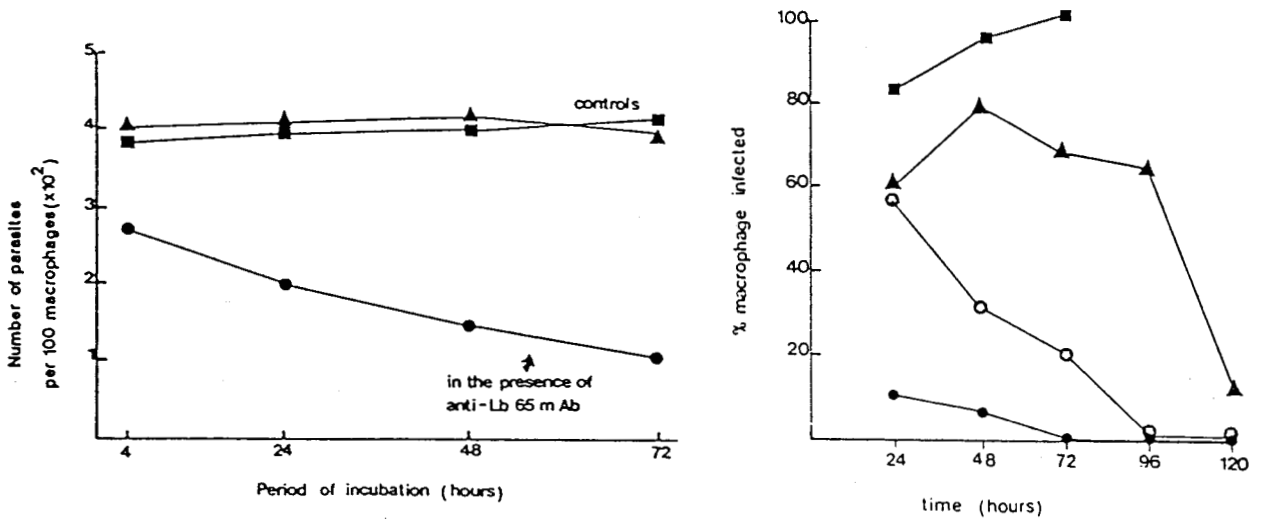


Figure 2. Survival of *L. braziliensis* treated with different mAbs in mouse peritoneal M ϕ *in vitro*. Controls represent the treatment of infective promastigotes with anti-*L. chagasi* IIB1/26 (\blacktriangle - \blacktriangle) & an unrelated AA3/44 (\blacksquare - \blacksquare) mAbs.

Figure 3. Effect of different mAbs on the infectivity of *L. chagasi* towards mouse M ϕ *in vitro*. The promastigotes were treated with IID4/9 (\bullet - \bullet), IIA4/3 (\oplus - \oplus), VH1/19 (\blacktriangle - \blacktriangle) and unrelated G5-54 (\blacksquare - \blacksquare) mAbs before co-culture with M ϕ .

Among the four mAbs generated against the infective form of *L. chagasi* promastigotes, one mAb (IID4/9 IgG1k) bound specifically to *in vitro* stationary phase and late stage sandfly promastigotes, and recognised an integral membrane glycoprotein of Mr 63,000 (GP63, pI 7.2) specifically on the surface of the stationary phase and not the log phase promastigotes. Moreover, this mAb could inhibit the infectivity of *Leishmania* towards mouse M ϕ *in vitro* (Fig. 3) suggesting the critical role of the molecule recognised by IID4/9 in *L. chagasi* M ϕ interactions. When lysates of surface-iodinated promastigotes from the log and stationary phase of culture were subjected to two-dimensional electrophoretic analysis, GP63 was revealed as two spots at apparent pI 6.6-7.0 on the surface of both log and stationary phase promastigotes while a third spot of pI 7.2 appeared specifically on the surface of stationary phase parasites (Fig. 4). Further, 2-D analysis of a mixture of immunoprecipitates obtained by IID4/9 and VH1/19 (anti log phase mAb) confirmed that these mAbs recognize two molecules of different pI respectively (Fig. 4D).

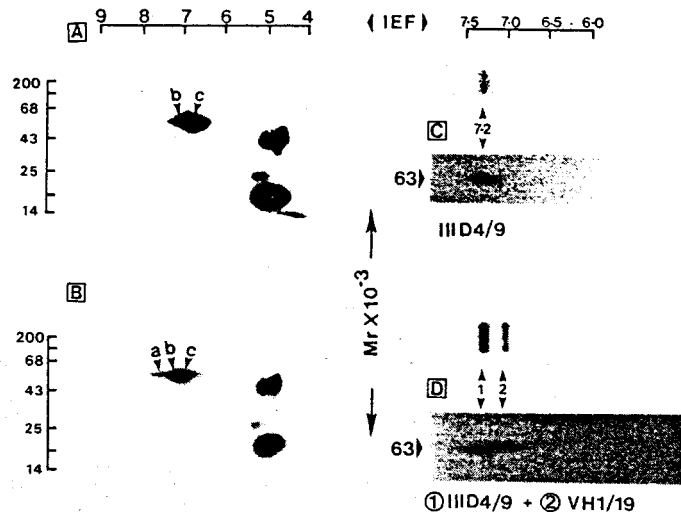


Figure 4. 2-D gel electrophoresis of surface-iodinated *L. chagasi* promastigotes. (A) log phase, (B) stationary phase, (C) immunoprecipitate using anti-stationary phase mAb and (D) a mixture of immunoprecipitates using anti-stationary and anti-log phase mAbs.

In view of the above findings one can not generalize the mechanism of the parasite $M\phi$ interactions to all *Leishmania* spp. It appears that at least two mechanisms of surface antigenic change are associated with the development of infective forms: the first suggested by Sacks *et al.* (1985) for *L. major* and Rizvi *et al.* (1985) for *L. chagasi* would be the appearance of new antigenic components and the second described here for *L. braziliensis* is the increasing expression of an epitope already existent on the surface of non-infective promastigotes. The mechanism controlling these expressions is unknown. Recent studies on the processing of GP65 have suggested that at least three proteins of closely apposed Mr and with different levels of glycosylation represent the precursors of the mature forms (Chang *et al.* 1986). Also, GP65 is an amphiphilic membrane protein anchored by covalently bound myristic acid (Bouvier *et al.* 1985) and can also be found in a hydrophilic form. The reason why log phase parasites expressing a similar GP65 are not infective is still unknown. Perhaps the number of copies/cell of this antigen is important for their infectivity. Other mechanisms involving a lipid containing glycoconjugate and/or complement have also been suggested to play a role in the promastigote- $M\phi$ interactions.

In conclusion, the infectivity of Leishmania promastigote is associated with surface antigenic expression. Such modified expression contributes to the protection of leishmaniae in the hostile activities of host cells. The specific antibodies against isolated new antigenic molecules can be used as molecular markers to identify and characterize infective leishmanial forms.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the expert technical assistance of Didier Deslée, Marc Loyens, Marie-Pierre Fourmaux and Marie-Christine Liebart. This investigation received the financial assistance from The Rockefeller Foundation, UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases and EEC (grant no. TSD-M-010-F(RS)).

REFERENCES

- Bouvier J, Etges RJ, Bordier C (1985) Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of Leishmania promastigotes, *J Biol Chem* 260:15504-15509
- Chang K P, Fong D (1983) Cell biology of host parasite membrane interactions in leishmaniasis In: *Cytopathology of parasitic diseases* Pitman Books, London, p 113-137
- Chang SC, Inserra TJ, Kink JA, Fong D, Chang K P (1986) Expression and size heterogeneity of a 63 kDa membrane glycoprotein during growth and transformation of Leishmania mexicana amazonensis, *Mol Biochem Parasitol* 18:197-210
- Giannini MS (1974) Effects of promastigote growth phase, frequency of subculture and host age on promastigote initiated infections with Leishmania donovani in golden hamster, *J Protozool* 21:521-527
- Keithly JA, Bienen (1981) Infectivity of Leishmania donovani primary culture promastigotes for golden hamster, *Acta Trop* 38:85-89
- Rizvi FS, Afchain D, Sherlock I, Sadigursky M, Capron A, Santoro F (1985) Infectivity of Leishmania promastigotes is associated with surface antigenic expression, *Immunol Lett* 11:317-323
- Sacks DL, Perkins PV (1984) Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes, *Science* 223:1417-1419
- Sacks DL, Hiény S, Sher A (1985) Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective stages of Leishmania major promastigotes *J Immunol* 135:564-569

Article 5

Etude de la différenciation morphologique *in vitro* des promastigotes de *L. chagasi* en fonction de leur maturation en culture.

Les promastigotes de *L.chagasi* subissent, au cours des cultures, une différenciation qui se traduit par des modifications de l'infectivité et de l'expression antigénique de surface des parasites. Le but de ce travail a été de rechercher, à l'aide de la cytométrie de flux, un critère caractéristique d'une éventuelle différenciation morphologique des parasites en culture. La cytométrie de flux étant une technique couramment utilisée pour trier les cellules en raison de différents paramètres morphologiques, nous avons désiré savoir si elle pouvait également mettre en évidence une différenciation des parasites, ce qui n'avait jamais été décrit auparavant.

Cette étude a été réalisée sur des promastigotes de *L. chagasi* provenant des différents jours de culture, soit vivants, soit fixés à l'aide de glutaraldéhyde puis incubés en présence de glycine et lavés dans du tampon isotonique. En utilisant deux faisceaux laser, un laser Néon-Hélium et un laser Argon, deux paramètres ont été étudiés systématiquement: le cône d'ombre (Light loss), et la diffusion aux petits angles (Forward scatter).

Ces paramètres varient dans le même sens; le plus sensible s'est révélé être la diffusion aux petits angles du laser Néon-Hélium. Les mêmes résultats ayant été obtenus pour les parasites vivants et fixés, avec toutefois une plus grande stabilité dans ce dernier cas, nous avons réalisé la suite de notre étude exclusivement sur les parasites fixés. A partir des histogrammes du nombre de particules en fonction de l'intensité de diffusion, on a déterminé pour chaque population de promastigotes, l'abscisse du maximum du pic.

La figure 5 représente l'intensité du "Forward scatter" pour les différentes populations de promastigotes en fonction de l'âge des cultures. Après un pic très aigu (entre 900 et 1000 unités) une quinzaine d'heures après le repiquage, à un moment où les observations en microscopie optique indiquent que les parasites, très condensés, présentent un aspect "en grain de café" jusqu'à un palier inférieur de 100-120 unités pour les populations en fin de phase stationnaire, lorsque les parasites sont plus larges, moins opaques et vacuolisés.

Ce travail a été complété en parallèle par des études morphologiques des promastigotes en microscopie optique après coloration de Giemsa, en microscopie électronique classique et en cryodécapage. Cette étude n'a pas permis de mettre en évidence de différences notables au

cours de la maturation des promastigotes; ceci nous montre que même si la nature biochimique de ses composants varie, l'ultrastructure de la membrane plasmique des promastigotes reste constante.

CONCLUSION

Nos observations tout à fait originales sont évidemment difficiles à interpréter. S'il est généralement admis que le cône d'ombre reflète la taille et la forme des particules, dans le cas du "Forward scatter" de nombreux paramètres peuvent intervenir. Il semble que, dans le cas présent, les variations de ce paramètre traduisent principalement les modifications de l'indice de réfraction, qui traduiraient des modifications internes des parasites; en effet, le "Forward scatter" est très élevé dans le cas de populations homogènes de parasites très condensés, et une valeur beaucoup plus basse dans le cas de promastigotes vacuolisés et beaucoup moins réfringents.

Ce paramètre semble donc constituer un véritable marqueur de différenciation des promastigotes en culture. Toute l'originalité de cette étude réside dans le fait que ce nouveau critère de différenciation peut également jouer le rôle de marqueur d'infectivité des promastigotes de *L. chagasi*.

Leishmania chagasi: In Vitro Differentiation of Promastigotes Monitored by Flow Cytometry

F. DARCY, G. TORPIER, J. P. KUSNIERZ, F. S. RIZVI, AND F. SANTORO

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM U 167—CNRS 624, (Directeur, Prof. A. Capron), Institut Pasteur, B.P. 245, 59019 Lille Cédex, France

(Accepted for publication 27 July 1987)

DARCY, F., TORPIER, G., KUSNIERZ, J. P., RIZVI, F. S., AND SANTORO, F. 1987. *Leishmania chagasi*: In vitro differentiation of promastigotes monitored by flow cytometry. *Experimental parasitology* 64, 376-384. A sequential development from a less infective to an infective stage of *Leishmania* promastigotes growing in culture has been previously reported. The aim of this work was to investigate whether freeze-fracture electron microscopy and flow cytometry would be able to provide some reliable morphological markers of *in vitro* differentiation of *Leishmania chagasi* promastigotes. The flow cytometry technique discriminates between the *L. chagasi* promastigotes from the different stages of their *in vitro* differentiation. The "forward scatter" intensity of the parasite, very high 15 hr after seeding when the parasites were very condensed and with a high DNA content per particle, strongly decreased during the culture course. Parallel experiments have shown a striking correlation between forward scatter intensity, growth curves, and infectivity of promastigote populations. By contrast, freeze-fracture techniques showed that in either less infective or infective promastigote plasma membranes, the intramembrane particles density in protoplasmic fracture faces (about 2800/ μm^2) and in exoplasmic fracture faces (about 1000/ μm^2) was independent of the time of cultivation. The amount of filipin lesions, which reflects the cholesterol content within the plasma membrane, was also constant throughout the culture course. Both data suggest that the architecture of the plasma membrane is an intrinsic characteristic of the promastigote stage. This study shows that whereas freeze-fracture electron microscopy does not provide markers for the differentiation of *Leishmania* promastigotes, flow cytometry may on the other hand be of value as a screening test for promastigote populations allowing the characterization of their developmental stages in *in vitro* cultures. © 1987 Academic Press, Inc.

INDEX DESCRIPTORS AND ABBREVIATIONS: *Leishmania chagasi*; Trypanosomatidae; Protozoa, parasitic; Culture promastigotes; Infective and noninfective stages; Differentiation; Flow cytometry; DNA content; Electron microscopy; Freeze-fracture; Glucose lactalbumin serum hemoglobin (GLSH); Hanks' balanced salt solution (HBSS); Phosphate-buffered saline (PBS); Intramembrane particles (IMPs); Protoplasmic fracture face (PF); Exoplasmic fracture face (EF); Deoxyribonucleic acid (DNA); Ribonuclease (RNase).

INTRODUCTION

The life cycle of *Leishmania* parasites includes two morphological stages of multiplication, intracellular nonmotile amastigotes within the vertebrate host mononuclear phagocytes and extracellular motile promastigotes within the alimentary tract of the sandfly vector or in axenic cultures.

A sequential development from a less infective to an infective stage of promastigotes growing in culture or in the insect

vector has been demonstrated in several *Leishmania* species (Sacks and Perkins 1984, 1985; Rizvi *et al.* 1985; Kweider *et al.* 1987). Although the ultrastructure of *in vivo* and *in vitro* promastigotes is similar, the reported changes in the morphology of the parasites obtained in different parts of the vector's gut (Molyneux *et al.* 1975; Killick-Kendrick 1979; Walters *et al.* 1987) are not clearly revealed during their growth in axenic cultures, as mentioned by Molyneux *et al.* (1975).

Leishmania chagasi: DIFFERENTIATION OF PROMASTIGOTES

We have previously demonstrated that the infective promastigotes (stationary phase in culture) of *Leishmania chagasi* present surface antigenic determinants different from less infective (log phase) ones (Rizvi *et al.* 1985).

The aim of the present work was to investigate whether the techniques of freeze-fracture electron microscopy and flow cytometry would be able to provide some reliable morphological markers accompanying the differentiation of *L. chagasi* promastigotes in culture.

MATERIALS AND METHODS

Parasites. Promastigotes of *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/81/Imperatriz) were cultured at 26 C in GLSH monophasic liquid medium (Jadin and Pierreux 1960) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (Boehringer, Mannheim, West Germany). At Day 0, cultures were started with 10^5 mid-log phase promastigotes/ml in 50 ml medium. Under these conditions, the parasites remained in dividing stage (log) up to the fourth day of culture when the stationary phase began (Lemesre *et al.* submitted for publication). The promastigotes were regularly tested for their *in vitro* infectivity toward mouse macrophages as previously described (Rizvi *et al.* 1985). Moreover, each culture was maintained until the parasites remained infective; a fresh culture from frozen promastigotes was initiated otherwise.

Electron microscopy. The parasites were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Na cacodylate, pH 7.2, and stored at 4 C until filipin treatment and freeze-fracturing. For the examination of ultrathin sections, fixed cells were postfixated with OsO_4 . After a final wash in distilled water, they were kept for 1 hr in 0.5% aqueous solution of uranyl acetate, dehydrated in acetone, and embedded in Araldite. Freeze-fracturing was performed in a Balzers BAF 300 apparatus equipped with an electron beam evaporation device and quartz thin film monitor. The membranes were fractured at -140 C using a double replica hinge device. After platinum-carbon evaporation, the replicas were cleaned with full-strength household bleach, washed in distilled water and mounted on 250-mesh grids for examination in a Philips EM420 electron microscope.

Counting of intramembrane particles and surface measurements were performed with a MOP/AM01 quantitative image analyzer (Kontron-Messgeräte). The total number of particles (6–14 nm) present within approximately $0.1 \mu\text{m}^2$ of either PFs or EFs of the cell body membranes ($\times 155,000$) was counted.

The density of IMPs per square micrometer was calculated for groups of 20 to 30 micrographs taken at random.

Filipin was obtained from Upjohn Co. (Kalamazoo, MI, U.S.A.). Samples of packed cells were thoroughly mixed with 20 vol of 0.3 mM filipin in 0.1 M Na cacodylate containing 2.5% glutaraldehyde and incubated at room temperature for 18 hr.

Flow cytometry. Promastigotes were harvested at various points of their growth curve, washed three times with HBSS, and fixed for 10 min at 4 C with 0.1% glutaraldehyde. After three washes in HBSS, they were stored until use at 4 C in HBSS containing 0.1 M glycine. For each assay, a minimum of 2×10^6 promastigotes in 200 μl buffer was required.

Measurements of forward angle light scatter and axial light loss were performed in an Orthocytofluorograf 50 H (Ortho Diagnostic Systems, Westwood, MA, U.S.A.) using either a helium-neon (630 nm) or an argon (488 nm) laser. Signals were recorded to produce histograms of cell counted versus the channel number of forward scatter or axial light loss intensity. A stored, fixed promastigote population was used as an internal standard in each run.

DNA staining. Prefixed promastigotes were initially treated for 30 min at 37 C with a solution of 1% RNase. After two washes in PBS, the staining solution (0.1 mg/ml ethidium bromide) was added. After 10 min incubation at room temperature, the supernatant was discarded and the parasites resuspended in PBS. Stained promastigotes were analyzed by both flow microfluorometry and fluorescence microscopy. Controls using fluorescence microscopy showed that the stain was restricted to kinetoplasts and nuclei.

RESULTS

Freeze-fracture study of the plasma membrane. In order to investigate whether the molecular differentiation of the parasite surface could be associated with ultrastructural changes in the outer plasma membrane, we performed a freeze-fracture study of promastigotes recovered from three points of their growth curve, 15 hr after seeding (latent phase), 3 days (log phase), and 7 days (late stationary phase). The two fracture planes of the plasma membrane of the cell body of *Leishmania chagasi* promastigotes can easily be recognized by an important difference in the density of their IMPs (Fig. 1A). The density is lower in the E face. Table I presents the values found for both faces of the

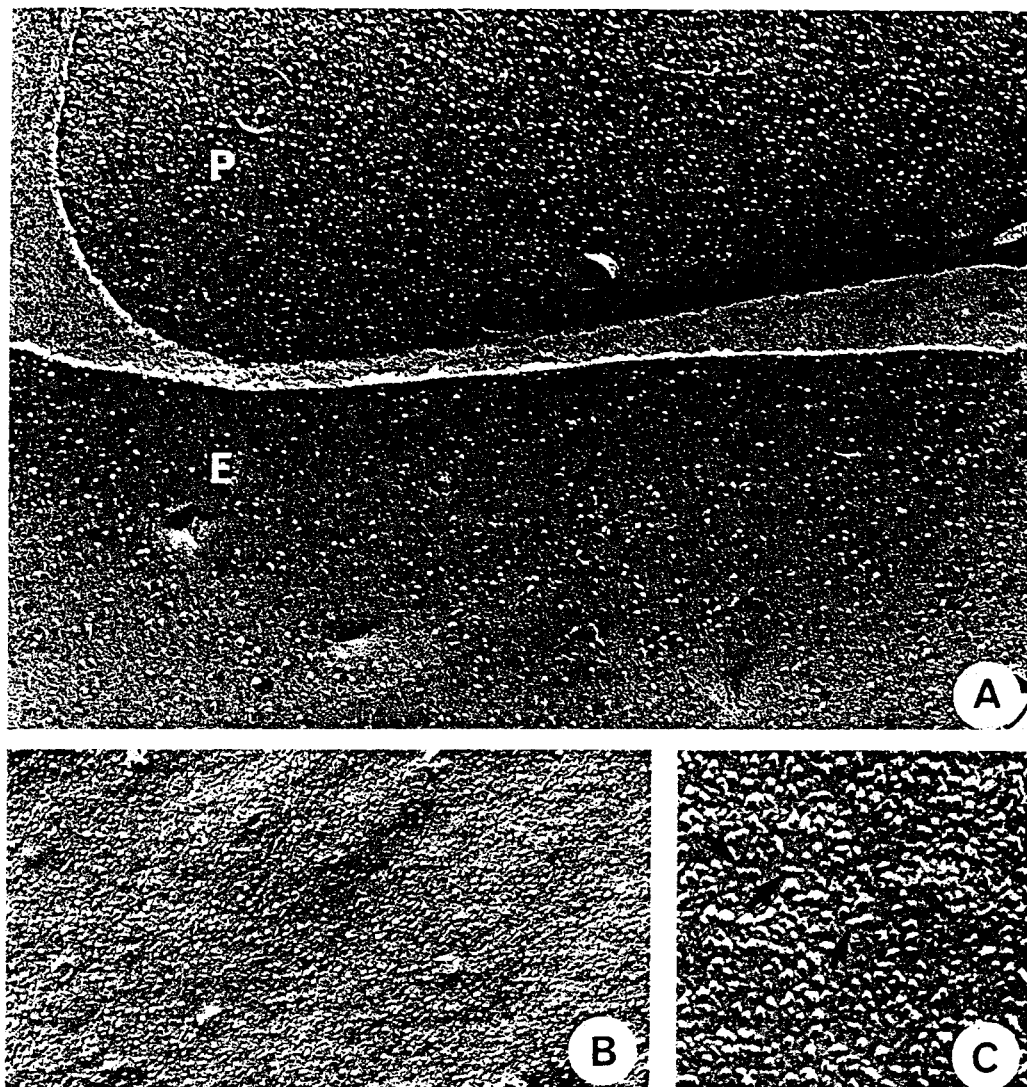


FIG. 1. Fracture faces of the plasma membrane of *Leishmania chagasi* promastigotes showing intramembrane particle distributions. (A) Protoplasmic (P) and exoplasmic (E) fracture faces of Day 3 promastigotes. (B-C) Protoplasmic face of 15-hr promastigote plasma membrane. Arrows indicate associations of particles whose diameter is <5 nm. (A) $\times 80,000$; (B) $\times 80,000$; (C) $\times 150,000$.

plasma membrane of cultured promastigotes. Generally, IMPs whose average diameter varies from 6 to 10 nm show a random distribution and have a constant affinity for the membrane leaflets of 15 hr, 3 day- and 7 day-old parasites (partition coefficient $P/E = 3$). In parasites recovered from the latent phase, elongated particles

about 20 nm long which are more or less deeply buried in the fracture planes are commonly observed (Fig. 1B). Some shadow incidences show that they represent, in fact, an association of particles whose diameter is <5 nm (Fig. 1C).

Freeze-fracture study after treatment with filipin. Using the polyene antibiotic

Leishmania chagasi: DIFFERENTIATION OF PROMASTIGOTES

TABLE I
Intramembrane Particle Distribution in the Plasma Membrane of *Leishmania chagasi* Promastigotes^a

Period in culture	Fracture face	
	P	E
15 hr	2760 ± 380	1150 ± 285
3 days	2970 ± 720	940 ± 150
7 days	2800 ± 340	940 ± 240

^a Per square micrometer ± standard deviation. The size of IMPs is in the range 6–14 nm.

filipin, we obtained ultrastructural evidence that the *L. chagasi* membrane was particularly rich in sterols (Fig. 2A). Characteristic doughnut-shaped lesions were observed in the body membrane fracture faces which displayed prevailing protuberances on the PF and pits on the EF (Figs. 2B, 2C). In all the forms of promastigotes observed, filipin-treated membranes had a comparable arrangement of filipin-induced deformations. The most striking feature of fracture faces was the very regular alignment of the protrusions in tracks (Fig. 2D). The interline spacings were constant and close to 30 nm which corresponded to the distance between the peripheral (subpellicular) microtubules (Fig. 2E).

Flow cytometry analysis. The same pattern of progression according to the time of parasite culture was observed by flow cytometry analysis of living and fixed promastigotes, although the living parasite parameters were about 10% higher. Data presented here relate to fixed parasites and were obtained with the helium–neon laser beam which proved to be more sensitive than the argon laser.

Figure 3 shows that the forward scatter intensity is threefold higher for early phase (2 days, Fig. 3A) than for stationary phase cultures (7 days, Fig. 3B).

Figure 4 presents the forward scatter and light loss intensities obtained with promastigotes from the second to the ninth day in culture. Whereas the light loss parameters decreased by less than 50%, a sharp drop

(from 480 to 150 units) of the forward scatter intensity was observed from the second to the seventh day when a plateau is attained. These parameters were very reproducible from one culture to another, provided that the culture conditions and particularly the number of parasites used for the seeding were the same.

In an attempt to explain the high forward scatter intensity of the early stage cultured parasites, we extended this study to promastigotes taken from 1 to 24 hr after seeding with 3-day-old promastigotes (Fig. 5). There was a sharp decrease in the forward scatter intensity (up to about 100 units), from 1 to 5 hr, then a strong increase with a maximum 15 hr after seeding (up to about 1000 units). Light loss intensity varied in the same fashion in the range of 80 to 380 units. Light microscopy observations showed that 15 hr after seeding promastigotes looked opaque and condensed with a typical "coffee-bean" shape. To correlate this densification with a possible modification of the DNA content per parasite, we analyzed the promastigotes by microfluorometry after staining with ethidium bromide. Figure 6 shows the comparison between the fluorescence intensity of the 3-day parasites used as the inoculum (Fig. 6A) and of the promastigotes recovered 15 hr after seeding (Fig. 6B). Besides a minor peak with a low DNA content (peak 1) which might represent parasite debris, the majority of the parasite population displayed a high fluorescence intensity. The cytofluorogram of 3-day-old promastigotes (Fig. 6A) revealed a major fluorescent population (peak 2) corresponding to the amount of DNA in resting parasites. In addition a shoulder (Fig. 6A, arrow) corresponding to parasites with a higher fluorescence intensity might represent the dividing parasites present in mid-log phase promastigote cultures. Fifteen hours after seeding, this slight shoulder gave rise to a prominent population (Fig. 6B, arrow). At this time, a peak corresponding to parasites

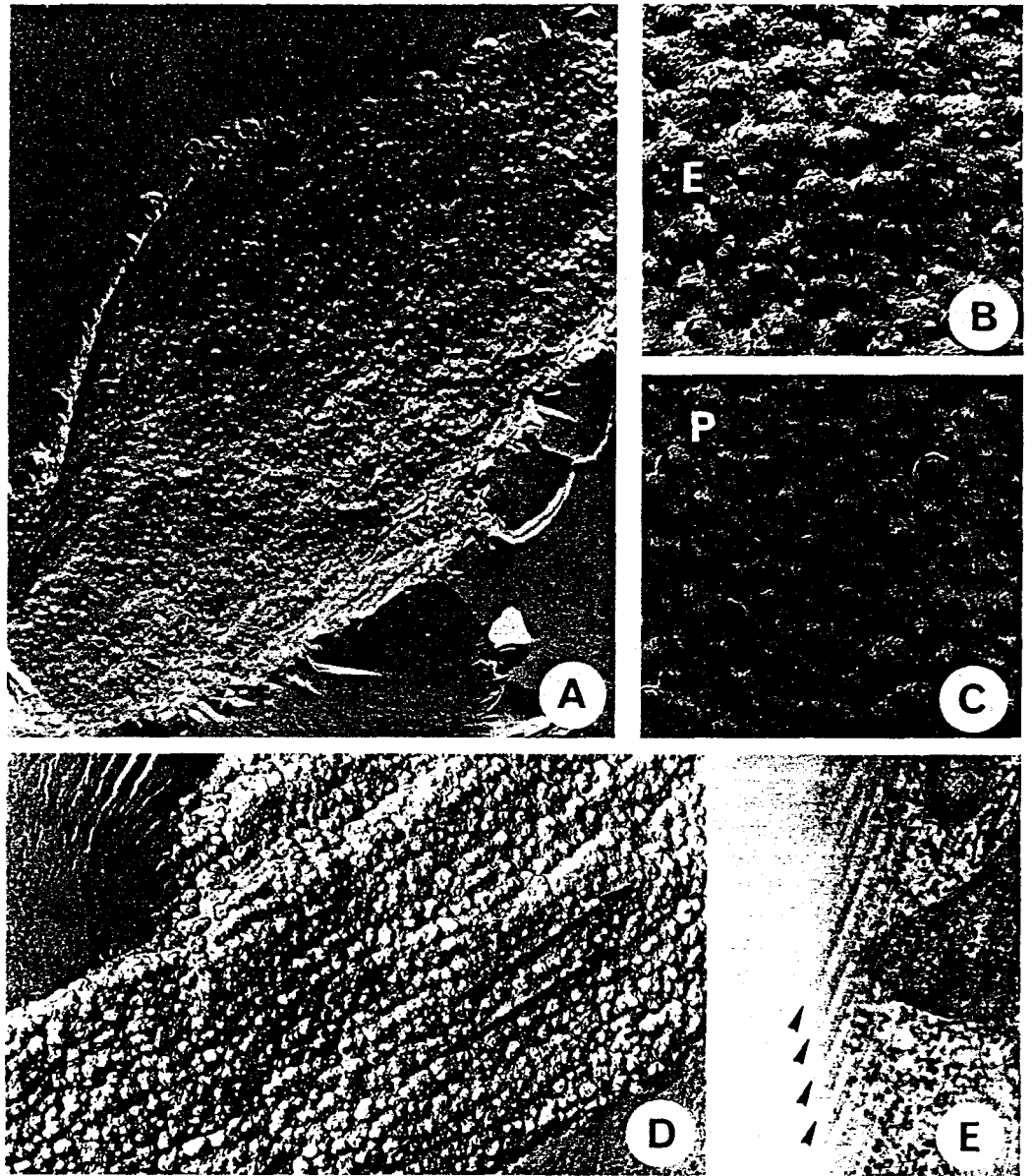


FIG. 2. Freeze-fracture replicas of filipin-treated *Leishmania chagasi* promastigotes. (A) General view of a fracture face of Day 3 promastigotes showing the relative distribution of filipin-induced lesions. (B–C) Details of protuberances and pits observed on the exoplasmic (E) and protoplasmic (F) fracture faces of 15-hr promastigotes. (D) Arrows indicate the direction of parallel arrays of the filipin-induced lesions in the promastigote plasma membrane. (E) The subpellicular microtubules of a promastigote body observed on a thin section are indicated by arrowheads. (A) $\times 27,000$; (B) and (C) $\times 124,000$; (D) and (E) $\times 42,000$.

with a still higher fluorescence intensity was also observed (Fig. 6B, asterisk).

A quantitative determination of the DNA

content of these populations (two, three, or even four DNA units) was not possible due to the fact that both nuclei and kinetoplasts

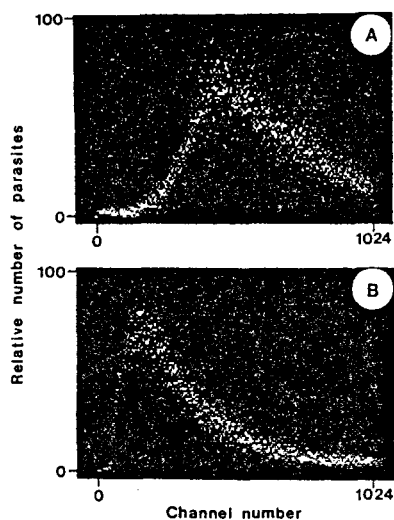
Leishmania chagasi: DIFFERENTIATION OF PROMASTIGOTES

FIG. 3. Forward scatter intensity of *Leishmania chagasi* promastigotes from Day 2 (A) and Day 7 (B) *in vitro* cultures.

stain with ethidium bromide. Parallel fluorescence microscopy observations show that 15 hr after seeding some parasites have two, three, or even four nuclei. These data corroborate and refine the findings of Greenblatt *et al.* (1985) who have shown in the case of *L. major* that Day 1 promastigote populations are highly heterogeneous in DNA content, and that a tendency toward a higher homogeneity and a decrease

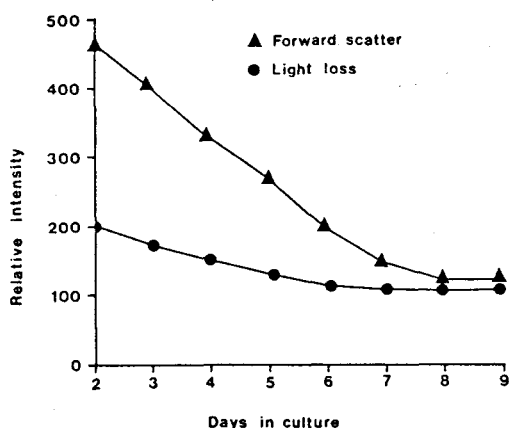


FIG. 4. Flow cytometry analysis of *Leishmania chagasi* promastigotes from different days in culture. Each point represents the channel number with the highest number of parasites as illustrated in Fig. 3.

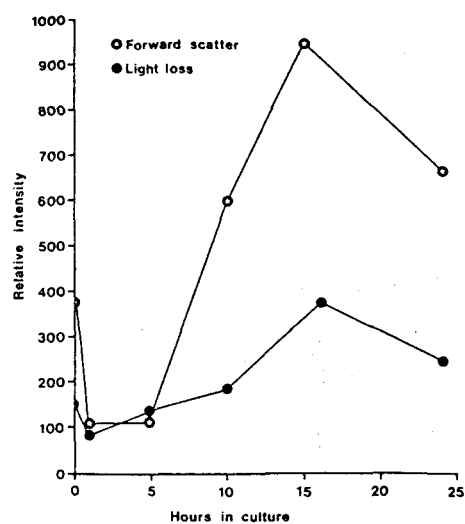


FIG. 5. Flow cytometry analysis of *Leishmania chagasi* promastigotes taken from 0 to 25 hr after seeding. Each point represents the channel number with the highest number of parasites.

in the DNA content per cell occurs as the culture progresses.

DISCUSSION

The *in vitro* differentiation of *Leishmania* promastigotes is accompanied by variations in the infectivity and surface antigenic modifications, both likely being correlated. By comparison with *Trypanosoma brucei* (Vickerman 1985) and *Leishmania* spp. (Franke *et al.* 1985) cycles in the insect vector, the infective promastigotes taken from stationary phase cultures are now referred to as "metacyclic" (Malinson and Coombs 1986; Killick-Kendrick 1986). To date, no objective morphological criteria are available to discriminate between early phase noninfective promastigotes which could be called "premetacyclic" and metacyclic promastigotes. For instance, although stationary phase parasites are generally shorter than log phase promastigotes, the body length cannot be used as a marker of differentiation since these size differences may not be considered very striking and also because the promastigote populations are highly heterogeneous

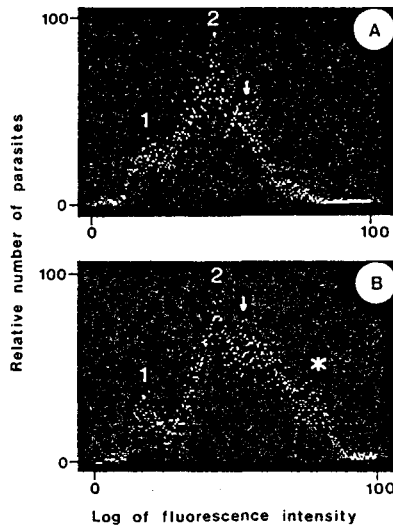


FIG. 6. Fluorescence intensity of ethidium bromide-stained *Leishmania chagasi* promastigotes from Day 3 cultures used for seeding (A) and 15 hr after seeding (B) 1, 2, ↓, and * refer to the different populations described in the text selected at the top of the peak of fluorescence intensity in channels 90, 225, 290, and >350, respectively.

(Greenblatt *et al.* 1985; Sacks *et al.* 1985). The present study is an attempt to find useful and precise parameters allowing us to characterize the *in vitro* developmental stages of *L. chagasi* promastigotes.

The freeze-fracture technique has been previously used to study infective and less infective organisms of a variety of protozoa (Hogan and Patton 1976; Vickerman and Tetley 1977; de Souza *et al.* 1978; Bernal *et al.* 1979; Souto-Padron *et al.* 1980; Honigberg *et al.* 1984). Using this technique together with the cytochemical marker filipin, we have investigated whether modifications in the structure of the promastigote plasma membrane accompanied their *in vitro* differentiation. The promastigote plasma membrane fracture faces exhibited the conventional particle partitioning in that the PFs had more densely packed smaller IMPs than the complementary EFs. The constant IMP density throughout the culture time course suggests that the architecture of the plasma membrane is an

intrinsic characteristic of the promastigote stage, independent of the time of cultivation. The IMP density in P faces of *L. chagasi* promastigotes is intermediate between those reported for *L. amazonensis* (2040/ μm^2 , Benchimol and de Souza 1980) and for *L. mexicana* (3640/ μm^2 , Tetley *et al.* 1986), whereas in EF, the IMP density is almost identical for the three *Leishmania* species.

The use of the polyene antibiotic filipin allowed us to state that in the plasma membrane of *L. chagasi* promastigotes, cholesterol seems to be in close association with the subpellicular microtubules as already reported for other protozoa such as *Trypanosoma cruzi* (Souto-Padron and de Souza 1983) or recently for *L. mexicana* (Tetley *et al.* 1986). A quantitative evaluation showed that the amount of filipin-induced lesions in *L. chagasi* promastigote plasma membrane was constant throughout the culture course, thus confirming the high stability of the structural components of the promastigote outer membrane.

Since these ultrastructural studies of the promastigote plasma membrane did not lead to the characterization of a simple marker of the parasite differentiation *in vitro*, we then turned to the flow cytometry technique. This technique proved to be suitable for discrimination between the *L. chagasi* promastigotes from the different stages of their *in vitro* differentiation. Indeed, among the various optical parameters studied, the "light loss" signals slightly varied and the "forward scatter" intensity strongly decreased during the culture course. The "forward scatter" signal is a complex function of the size, refractive index, and reflective properties of particles (Salzman *et al.* 1979). In the present case, the size cannot be the only intervening factor since the light loss intensity which mostly reflects the size varies only slightly. Interesting is the observation of Leary *et al.* (1982) who showed in the case of pneumocytes that cells with many optically

- LEMESRE, J. L., DARCY, F., KWEIDER, M., CAPRON, A., AND SANTORO, F. Requirements of defined cultivation conditions for standard growth of *Leishmania* promastigotes *in vitro*. *Acta Tropica*, submitted for publication.
- MALLINSON, D. J., AND COOMBS, G. H. 1986. Molecular characterization of the metacyclic forms of *Leishmania*. *IRCS Medical Science* 14, 557-558.
- MOLYNEUX, D. H., KILLICK-KENDRICK, R., AND 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, 341-357.
- 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. *Immunology Letters* 11, 317-323.
- SACKS, D. L., HIENY, S., AND SHER, A. 1985. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between non-infective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *Journal of Immunology* 135, 564-569.
- SACKS, D. L., AND PERKINS, P. V. 1984. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 223, 1417-1419.
- SACKS, D. L., AND PERKINS, P. V. 1985. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sandflies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34, 456-459.
- SALZMAN, G. C., MULLANEY, P. F., AND PRICE, B. J. 1979. Light scattering approaches to cell characterization. In "Flow Cytometry and Sorting" (M. R. Melamed, P. F. Mullaney, and M. L. Mendelsohn, Eds.), pp. 105-124. Wiley, New York.
- SOUTO-PADRON, T., DELIMA, L. V. M. Q. G., ROITMAN, I., AND DE SOUZA, W. 1980. Fine structure study of *Leptomonas samueli* by the freeze-fracture technique. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 62, 145-157.
- SOUTO-PADRON, T., AND DE SOUZA, W. 1983. Freeze-fracture localization of filipin-cholesterol complexes in the plasma membrane of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology* 69, 129-137.
- TETLEY, L., COOMBS, G. H., AND VICKERMAN, K. 1986. The surface membrane of *Leishmania mexicana mexicana*, comparison of amastigote and promastigote using freeze-fracture cytochemistry. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 72, 281-292.
- VICKERMAN, K. 1985. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *British Medical Bulletin* 41, 105-114.
- VICKERMAN, K., AND TETLEY, L. 1977. Recent ultrastructural studies on trypanosomes. *Annales de la Société belge de Médecine Tropicale* 57, 441-455.
- WALTERS, L. L., MODI, G. V., TESH, R. B., AND BURRAGE, T. 1987. Host-parasite relationship of *Leishmania mexicana mexicana* and *Lutzomyia abonnenci* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36, 294-314.

Article 6

La glycoprotéine majeure de surface de *Leishmania chagasi* présente une réactivité immunologique croisée avec la fibronectine humaine.

L'interaction *Leishmania*-macrophage a reçu beaucoup d'importance durant les cinq dernières années. De nombreux mécanismes ont été décrits en ce qui concerne l'attachement du promastigote à la surface des cellules hôtes. Le récepteur de type lectine spécifique du mannose, du fucose et de la GlcNAc et le récepteur CR3 spécifique du composant C3bi du complément présents sur la membrane plasmique des macrophages semblent impliqués dans l'attachement des promastigotes par le biais d'une glycoprotéine de 63 kDa comme le ligand. Récemment, un récepteur pour la Fn ainsi que son rôle dans l'attachement des promastigotes a été démontré. La Fn est une glycoprotéine de haut poids moléculaire qui est un constituant majeur de la matrice extracellulaire de la plupart des cellules mononucléées. Le but de notre travail a été d'identifier et caractériser les molécules de surface des promastigotes exprimant le récepteur pour la Fn.

Nous n'avons trouvé aucune molécule qui peut se lier spécifiquement à la Fn. Par contre une réactivité croisée entre la Fn et la glycoprotéine majeure de surface des promastigotes de *Leishmania chagasi* a été démontrée. En effet, des anticorps polyclonaux ainsi que des anticorps monoclonaux dirigés contre la Fn ont précipité deux molécules de 63 et 58 kDa, à partir des antigènes de surface des promastigotes marqués à l'iode 125. Les mêmes polypeptides ont été également identifiés dans les antigènes parasitaires marqués à la méthionine ³⁵S. De plus, ces deux molécules sont reconnues par un anticorps monoclonal dirigé contre un fragment de 15 kDa de la Fn contenant la séquence Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) qui constitue le site de fixation de la Fn aux récepteurs cellulaires. Le complexe 63-58 kDa a été également immunoprécipité par des anticorps polyclonaux de souris immunisés par le peptide RGDS couplé à une protéine porteuse. Des expériences d'inhibition d'immunoprécipitation en présence de RGDS nous ont permis de confirmer ces résultats. Une deuxième confirmation a été obtenue lors d'expériences d'immunoprécipitation de produits de traduction d'ARN messager de promastigotes avec les mêmes anticorps. Ces expériences nous ont permis de plus d'estimer à 52 kDa le p.m. du corps peptidique du complexe gp63-58.

L'ensemble de ces résultats nous conduit à penser que la séquence RGDS est portée par ce complexe majeur antigénique. Des expériences d'inhibition d'invasion des macrophages par les parasites ont été également réalisées, nous avons observé que le traitement préalable des promastigotes par des F(ab)'₂ d'IgG anti-Fn ou la saturation des récepteurs Fn des macrophages par du RGDS, inhibe l'infection des cellules par le parasite. Ces résultats plaident également en faveur de l'interaction du complexe gp63-58 avec le récepteur Fn du macrophage par le biais de la séquence RGDS. De plus, des préparations antigéniques riches en complexe gp63-58 peuvent faciliter l'attachement et l'étalement des fibroblastes 3T3 de souris sur un support coaté avec l'antigène.

CONCLUSION

Les résultats suggèrent clairement que le complexe antigénique 63-58 kDa présent à la surface des promastigotes de *Leishmania chagasi* présente une réactivité immunologique croisée avec la Fn et qu'il possède certaines caractéristiques biologiques et moléculaires semblables à celles de la Fn. Nos résultats suggèrent un nouveau modèle expliquant une étape d'adhésion alternative: les promastigotes possédant en surface une structure "Fibronectine-like" se lieraient aux récepteurs pour la Fn présents à la surface des macrophages par le biais de la séquence RGDS contenue dans le complexe gp63-85. En utilisant des anticorps monoclonaux dirigés vis-à-vis du site d'attachement cellulaire de Fn et des peptides synthétiques contenant la séquence RGDS, nous avons obtenu la preuve indirecte de l'existence d'une telle structure à la surface des parasites.

Short paper

Farrukh S. Rizvi,
Mohamed Ali Ouaisi,
Béatrice Marty,
Ferruccio Santoro and
André Capron

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

The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a fibronectin-like molecule*

The major surface glycoprotein of *Leishmania chagasi* promastigotes showed cross-reactivity with fibronectin (Fn), a large glycoprotein that is a major constituent of the extracellular matrix of most mononuclear cells. Polyclonal and monoclonal antibodies against Fn precipitated two molecules of 63–58 kDa from the lysates of both ^{125}I and ^{35}S methionine-labeled promastigotes. In addition, a monoclonal antibody against a 15-kDa fragment of Fn containing the Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) sequence and several polyclonal monospecific mouse antibodies against a synthetic RGDS peptide also recognized the above two molecules. The attachment of *Leishmania* promastigotes to mouse peritoneal macrophages *in vitro* was partially inhibited when promastigotes were treated with F(ab)'_2 fragment of an anti-Fn IgG. Identical results were obtained by saturating the Fn receptors on macrophages using different peptides containing the RGDS sequence. Moreover, antigen preparations rich in glycoprotein 63 could efficiently promote the attachment and spreading of 3T3 mouse fibroblasts to surfaces coated with the antigen. These results clearly suggest that the gp63 of *L. chagasi* promastigotes is an Fn-like molecule that shares certain biological and molecular characteristics with Fn.

1 Introduction

During the transmission of *Leishmania* from the sandfly to man, the extracellular promastigote must attach to cells for intracellular survival and for the development of disease. The promastigote-macrophage (M Φ) interactions have received considerable attention during the past few years [1–3]. Many investigators have shown that the attachment of promastigotes to mononuclear cells is a specific receptor-mediated event, and that some components on the surface of promastigotes are involved in the ligand-receptor system [4–10]. In most of the reports, an integral membrane glycoprotein of 63 kDa (gp63) has been shown to play a key role in these interactions by using M Φ receptors for C3bi and fucose-mannose [11, 12]. Emphasis has also been placed on other mechanisms involving the receptors for major surface glycolipids and for proteins containing covalently attached advanced glycosylation end products [4, 13, 14]. Recently, a fibronectin (Fn)-mediated attachment of *Leishmania* to the host cell surface has been demonstrated [15]. These authors have also observed that polyclonal anti-Fn antibodies could inhibit parasite attachment to cells. This led us to explore the possibility of Fn-like characteristics on the surface of *Leishmania* promastigotes. By using polyclonal and monoclonal antibodies (mAb) against the Fn molecule, the cell-binding domain of its monomer and synthetic peptides, we report here that gp63 of *Leishmania chagasi* is

[I 6530]

* This work was supported by UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.

Correspondence: Farrukh S. Rizvi, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM U 167-CNRS 624, Institut Pasteur, 1, rue du Professeur Calmette, F-59019 Lille Cédex, France

Abbreviations: M Φ : Macrophage(s) Fn: Fibronectin gp63: Promastigote surface glycoprotein of 63 kDa molecular mass RGDS: Arg-Gly-Asp-Ser AKTKP: Ala-Lys-Thr-Lys-Pro mAb: Monoclonal antibody(ies)

an Fn-like molecule that shares certain biological and molecular characteristics with Fn. We discuss the intelligent strategy employed by the promastigote by presenting its gp63 as an Fn-like entity to Fn receptors on M Φ to ensure a successful attachment.

2 Materials and methods

2.1 Polyclonal antibodies and mAb

Polyclonal anti-Fn antibodies were raised in New Zealand White rabbits by repeated s.c. injections of 1 mg of the protein in Freund's complete adjuvant. Polyclonal anti-peptide antibodies were prepared by immunizing BALB/c mice with synthetic peptides conjugated to tetanus toxoid through the deprotected sulfhydryl group with maleimidocaproyl-N-hydroxysuccinimide ester. mAb against the Fn molecule (M1205) and the cell binding domain of its monomers (3E3) were the gifts of J. A. Grimaud (Lyon, France) and M. Pierschbacher (La Jolla, CA).

2.2 Preparation of labeled antigens

The promastigotes were labeled with ^{125}I in the presence of Iodogen as described elsewhere [7]. For metabolic labeling the starved promastigotes of *L. chagasi* were incubated for 1 h with 250 μCi = 9.25 MBq of ^{35}S methionine at 26°C. The reaction was stopped with an excess of cold methionine, and the labeled promastigotes were washed and extracted in 0.1 M phosphate-buffered saline containing 0.5% Nonidet-P40 (NP40) in the presence of protease inhibitors as previously described [7].

2.3 Peptide synthesis

The peptides were synthesized by a solid-phase method described elsewhere [16]. Briefly the cesium salt of the *tert*-

butyloxycarbonyl-S-acetamido-methyl-L-cysteine was reacted with Merrifield resin and the protected peptidyl resin was built in the usual manner by the Boc-TFA (*tert*-butyloxycarbonyl-trifluoroacetic acid) scheme. The protective groups (except acetamidomethyl) were removed, and the peptide was cleaved from the resin at 0°C with anhydrous hydrogen fluoride (HF) and methylethylsulfide as scavengers. The HF reagent was removed under vacuum at 0°C and the peptide was precipitated, washed with anhydrous ether and extracted with 5% acetic acid.

2.4 Immunoprecipitation and autoradiography

Immunoprecipitations were performed at room temperature, and the immune complexes were separated by protein A-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Sweden) at 4°C. After elution in the presence of 2-mercaptoethanol, the components were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and autoradiographed on high performance autoradiography films (Amersham International, Amersham, GB).

2.5 *In vitro* promastigote-M Φ interaction

The inhibition of *Leishmania* attachment to M Φ was studied in *in vitro* assays. Approximately 2.5×10^5 M Φ from the peritoneal cavity of unstimulated mice were cultivated on coverslips in each well of a 24-well culture plate [6]. After a 4-h incubation at 37°C with 5% CO₂ in air the nonadherent cells were washed away. The promastigotes of *L. chagasi* were washed extensively with Hanks' balanced salt solution (HBSS) and were incubated with different dilutions of the F(ab')₂ fragment of a rabbit anti-Fn IgG at 4°C for 1 h. The promastigotes were then added to the wells containing M Φ at a ratio of 20 promastigotes/cell. At the end of a 30-min incubation the number of promastigotes attached to the M Φ was counted in

500 cells in duplicate. In a separate experiment the M Φ were incubated with different concentrations of the synthetic peptides for 1 h at 37°C before receiving the promastigotes.

2.6 Attachment of 3T3 fibroblasts to antigen-coated surface

The attachment of 3T3 fibroblasts to polystyrene microtiter wells was studied by coating wells with Fn and a gp63-rich preparation of *L. chagasi* promastigotes. Each protein was coated to wells from 10 µg/ml up to 1 mg/ml. Each coated well received 10⁴ 3T3 cells. After 1 h incubation, unattached cells were washed off, and wells were fixed and stained with Giemsa. The number of cells attached in each well was determined by using the computer-controlled image analyzer model AMS 40-10 (Analytical Measuring System Ltd., Essex, GB).

3 Results and discussion

Mononuclear phagocytes possess plasma membrane receptors for Fn [17], a large glycoprotein that is a major constituent of the extracellular matrix and is also synthesized by these cells [18]. Polyclonal anti-Fn antibodies raised in rabbits precipitated two molecules of apparent Mr of 63 000-58 000 from the NP40 lysates of ¹²⁵I-labeled *L. chagasi* promastigote surface (Fig. 1). These antisera also reacted with the surface of both glutaraldehyde-fixed and live promastigotes in indirect fluorescent antibody tests. Identical results were obtained by a mAb (M1205) against the Fn molecule.

Since the ability of Fn to bind to cells could be accounted for by the tetrapeptide L-Arg-Gly-L-Asp-L-Ser (RGDS), a sequence which is part of the cell attachment domain of Fn [19], we used the following synthetic peptides modelled from the sequence of this domain to inhibit the binding of anti-Fn antibodies to gp63 in immunoprecipitation: Arg-Gly-Asp-Ser, Ala-Val-Thr-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Cys-[Acm] and Cys-

Table 1. Effect of anti-Fn antibodies and synthetic peptides modeled from the cell binding domain of Fn on the attachment of *Leishmania chagasi* to mouse peritoneal M Φ *in vitro*

Exp	Antibodies or synthetic peptides	Dilutions or conc. (µg/ml)	Attachment (% ± SEM)	No. of promastigotes attached per 100 M Φ (± SEM)	Inhibition (%)
I					
Treatment of promastigotes with					
F(ab') ₂ fragment of anti-Fn rabbit IgG	1:10	1	20.0 ± 1.7	212 ± 4.7	72.4
	1:20	1	20.2 ± 2.0	296 ± 5.5	72.2
	1:30	1	24.5 ± 1.7	495 ± 8.6	66.2
	1:40	1	29.2 ± 1.5	935 ± 2.1	59.8
F(ab') ₂ fragment of normal rabbit IgG	1:10	1	64.7 ± 2.8	1965 ± 6.7	10.8
II					
Treatment of M Φ with					
Peptide 1 ^{a)}	10	10	36.2 ± 1.7	274 ± 4.5	50.0
	100	100	26.0 ± 1.4	141 ± 6.2	64.1
Peptide 2 ^{b)}	10	10	47.7 ± 3.4	335 ± 9.5	35.1
	100	100	46.7 ± 2.0	304 ± 4.9	35.5
Peptide 3 ^{c)}	10	10	49.7 ± 4.0	338 ± 11.9	31.4
	100	100	46.2 ± 1.0	386 ± 2.4	36.1
Peptide 4 ^{d)}	10	10	65.2 ± 2.4	1236 ± 3.3	10.0
	100	100	66.7 ± 1.0	1266 ± 9.5	9.0
Control ^{e)}			72.2 ± 2.6	1530 ± 6.2	

- a) Peptide 1: Arg-Gly-Asp-Ser.
 b) Peptide 2: Ala-Val-Thr-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Cys-[Acm].
 c) Peptide 3: Cys-[Acm]-Val-Thr-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Cys-[Acm].
 d) Peptide 4: Ala-Lys-Thr-Lys-Pro.
 e) Control represents the absence of antibodies and peptides.

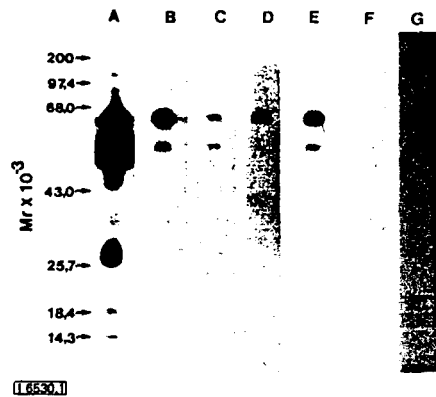


Figure 1. Autoradiography of ^{125}I -labeled surface components of *L. chagasi* promastigotes precipitated by different polyclonal and mAb, and separated by SDS-PAGE. (A) Hyperimmune rabbit anti-promastigote serum; (B) polyclonal rabbit anti-Fn antibodies; (C) anti-Fn (M1205) mAb; (D) anti-15-kDa fragment of Fn containing RGDS (3T3 mAb); (E) mouse polyclonal anti-RGDS antibodies. The immunoprecipitation was inhibited by the peptides containing RGDS (F) and not AKTKP (G).

[Acm]-Val-Thr-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Cys-[Acm], where Cys was always blocked by an acetamidomethyl (Acm) group. One out of these three peptides (RGDS) could efficiently inhibit the precipitation of gp63 by anti-Fn antibodies. Other larger peptides did inhibit the reaction but at higher concentrations. Contrary to this an unrelated peptide, Ala-Lys-Thr-Lys-Pro (AKTKP), was ineffective. This clearly indicates that the anti-Fn antibody binding domain on gp63 is similar to that for Fn. Furthermore, a mAb (3E3) against a 15-kDa fragment of Fn containing the RGDS sequence [20] and several polyclonal monospecific mouse antibodies against the synthetic RGDS peptide also recognized the above two molecules on the surface of the promastigote.

In certain experiments a high mol. mass component of about 200 kDa was also recognized by both mAb and polyclonal antibodies on the radiolabeled promastigote surface. This was perhaps Fn itself attached to the promastigote surface and derived from the culture medium, that would have been labeled with ^{125}I . To confirm this, the parasite were metabolically labeled with [^{35}S]methionine and lysates subjected to immunoprecipitation with different antibodies. Fig. 2 shows

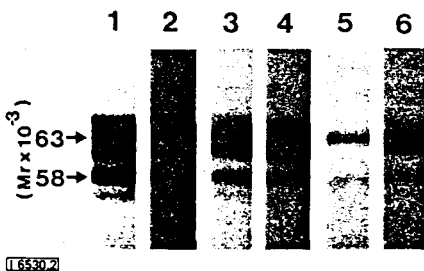


Figure 2. SDS-PAGE analysis and autoradiography of [^{35}S]methionine-labeled promastigote antigens immunoprecipitated by different antibodies. (1) Polyclonal anti-Fn antibody; (2) anti-Fn mAb (M1205); (3) anti-15-kDa fragment of Fn containing the RGDS sequence (3E3 mAb); (4) polyclonal anti-RGDS antibody. The immune complex formation was inhibited by the RGDS-containing peptide (5) and not by an unrelated one (6).

that the bands (gp63 and 58) are of parasite origin and the reaction is inhibitable by synthetic peptides containing RGDS and not by unrelated ones. In addition, immunoprecipitation of the *in vitro* translation products from *L. chagasi* promastigote mRNA with anti-Fn antibodies permitted the identification of a molecule of 52 kDa which might correspond to the peptide core of the 63-58-kDa complex (results not shown).

Another approach to this study involved the effect of anti-Fn antibodies and several synthetic peptides on *in vitro* promastigote-M Φ interaction. $\text{F(ab}')_2$ fragments of anti-Fn IgG partially abolished promastigote attachment to mouse peritoneal M Φ (Table 1) when the promastigotes were treated with different concentrations of the antibody. Furthermore, more or less the same degree of inhibition was also achieved when M Φ were saturated by different peptides containing the RGDS sequence. However, complete inhibition could never be achieved in either case.

Thus, the above results clearly indicate that gp63 is an Fn-like molecule and shares several properties in common with that of Fn. That the 58-kDa molecule co-precipitated with that of 63 kDa has been suggested by some authors to be due to incomplete denaturation of the sulfhydryl group of the gp63 [21]. The RGDS sequence has been found in proteins from several primitive organisms. The receptors of *E. coli*, lam B protein, sindbis virus coat protein share an RGDS sequence but show no other detectable homology with Fn [20, 22]. The presence of the RGDS sequence in yellow fever virus, foot-and-mouth disease virus and human influenza A virus helps the viruses enter host cells by allowing them to bind to host RGD receptors [23].

Although a long list of receptor-ligand mechanisms described for *Leishmania* sp. is available, our results support the hypothesis that the promastigote may bind to the Fn receptor of mononuclear cells through the putative RGDS sequence of its gp63. Moreover, it is also possible that the gp63 may even react with Fn present on cell surfaces. Since the Fn molecule can react with itself to form polymers, the gp63 being Fn-like may also form polymers either by reacting with itself or with Fn molecules. In fact, antibody affinity purification of gp63 gives rise to a molecule of 400 kDa (≈ 6 units of 63) detectable by gel filtration [10]. Also, the molecular mass determined by quantitative electron scattering indicates that the major surface antigen is a dimer formed by two 63-kDa subunits [24]. The above hypothesis can be strengthened by the fact that the expression of gp63 is effectively increased as promastigotes enter the stationary phase to become infective, and in nutrient-depleted stationary cultures the promastigotes form strong rosettes [6, 8]. The RGD sequence is also reported to be involved in the recognition of the *Dictyostelium* aggregation protein discoidin I by its receptor [25]. The cellular slime mold *D. discoideum* exists in a unicellular state while feeding on bacteria but differentiates to an aggregated state when deprived of food.

The findings presented in this report are interesting in the light of the concept of adhesiotopes. In recent work it has been shown that the trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease, possess the receptor for Fn [26]. In addition, the cloning of a major surface-antigen gene has led to the identification of a nonapeptide unit that is tandemly repeated five times. Each repeat unit contains the Gly-Asp-Ser (GDS) sequence [27]. These results suggest that the GDS sequence of *T. cruzi* could play a role in parasite attach-

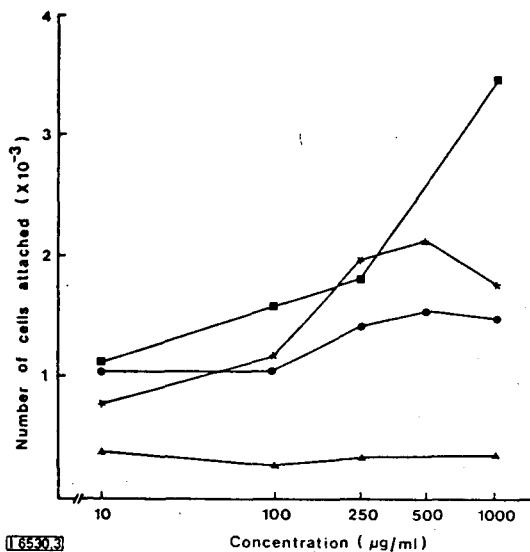


Figure 3. Attachment of 3T3 fibroblasts to polystyrene microtiter wells coated with Fn (■—■), stationary phase promastigote antigen (★—★), logarithmic phase promastigote antigen (●—●) and bovine serum albumin (▲—▲). Each point on the curve represents the mean of three individual counts for a given concentration of the protein in each well.

ment to the host cell Fn receptor. This can be confirmed only by using anti-cell Fn receptor antibodies. Moreover, it may be possible that the GDS sequence of the parasite interacts with the RGDS peptide of cell surface Fn. In fact, in recent experiments we have observed that an excess of RGDS peptides could induce an aggregation of the trypomastigotes of *T. cruzi* (Ouaisi et al., in press). This phenomenon appears to involve a peptide-peptide interaction that may be RGDS dependent. Thus, the RGDS sequence in the gp63 of *Leishmania* promastigote might equally bind to the RGDS sequence of Fn not occupied on cell surfaces if RGD receptors are not available. Indeed, some authors suggest that anti-Fn antibodies inhibit the promastigote attachment to cells either by interacting with Fn on the parasite surface or by acting to sterically hinder some other attachment ligands in the vicinity of surface-bound Fn [15]. Until now, however, we have been unable to identify any specific Fn-binding molecules on the surface of *Leishmania* promastigote.

There are some other characteristics common to both gp63 and Fn molecules that could support the idea of gp63 being an Fn-like molecule. Both Fn and gp63 molecules contain proteolytic activity [24, 28] and both of them are capable of fixing various complement components [9, 29]. The major surface protein of *Leishmania* sp. has recently been identified as promastigote surface protease [24] that can bind to a receptor of the MΦ membrane. Also, certain α-lytic proteases have been found to contain the RGDS sequence [30]. In preliminary experiments, the antigen preparation of *Leishmania* promastigotes rich in gp63 could efficiently promote the attachment and spreading of mouse fibroblasts (3T3) to surfaces coated with it (Fig. 3). Contrary to this, bovine serum albumin at the same concentration was ineffective. These results give an indication that the gp63 also shares some biological activities with Fn. A variety of other proteins such as collagen, fibrinogen, thrombin, contain the RGD sequence and, therefore, have the same capacity as Fn to interact with

cell surfaces. The lambda receptor of *E. coli*, containing this sequence, actively promotes the attachment of rat kidney cells. The search for such a sequence in the gp63 of *Leishmania* promastigote is underway.

In conclusion, our study adds a new mechanism to a growing list of receptor ligand interactions potentially involved in *Leishmania*-host cell relationship. Nevertheless, the parasite-cell association is complicated, involving an array of receptor-ligand systems, and the precise mechanism whereby this parasite gains entry into mononuclear cells is yet to be defined.

We thank M. Loyens for technical assistance, A. Tartar and H. Gras-Masse for synthesizing peptides, and C. Colson and M. F. Massard for secretarial assistance.

Received December 2, 1987.

4 References

- Wyler, D. J., *J. Clin. Invest.* 1982. 70: 82.
- Chang, K.-P., *Int. Rev. Cytol.* 1983. 14: (Suppl.) 267.
- Chang, K.-P. and Fong, D., *Cytopathology of Parasitic Diseases, Ciba Found. Symp.* 1983. 99: 113.
- Handman, E. and Goding, J. W., *EMBO J.* 1985. 4: 329.
- Blackwell, J. M., Ezekowitz, R. A. B., Roberts, J. V., Channon, B., Sim, R. B. and Gordon, S., *J. Exp. Med.* 1985. 162: 324.
- Rizvi, F. S., Afchain, D., Sherlock, I., Sadigursky, M., Capron, A. and Santoro, F., *Immunol. Lett.* 1985. 11: 317.
- Lemesre, J. L., Rizvi, F. S., Afchain, D., Sadigursky, M., Capron, A. and Santoro, F., *Infect. Immun.* 1985. 50: 136.
- Santoro, F., Kweider, M., Lemesre, J. L., Darcy, F. and Rizvi, F. S., in Chang, K.-P. and Snary, D. (Eds.), *Molecular and Cellular Interactions in Protozoal Infections*, NATO ASI Series, Vol. H11, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1987, p. 117.
- Russell, D. G. and Wilhelm, H., *J. Immunol.* 1986. 136: 2613.
- Chang, C. S. and Chang, K.-P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986. 83: 100.
- Mosser, D. M. and Edelson, P. J., *J. Immunol.* 1985. 135: 2785.
- Blackwell, J. M., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1985. 79: 606.
- Wilson, M. E. and Pearson, R. D., *J. Immunol.* 1986. 136: 4681.
- Mosser, D. M., Vlassara, H., Edelson, P. J. and Cerami, A., *J. Exp. Med.* 1987. 165: 140.
- Wyler, D. J., Sypek, J. P. and McDonald, J. A., *Infect. Immun.* 1985. 49: 305.
- Ouaisi, M. A., Cornette, J., Afchain, D., Capron, A., Gras-Masse, H. and Tartar, A., *Science* 1986. 234: 603.
- Bevilacqua, M. P., Amrami, D., Mosesson, W. and Bianco, C., *J. Exp. Med.* 1981. 153: 42.
- Alitalo, K., Houi, T. and Vaheri, A., *J. Exp. Med.* 1980. 151: 602.
- Pierschbacher, M. D. and Ruoslahti, E., *Nature* 1984. 309: 30.
- Pierschbacher, M. D., Hayman, E. G. and Ruoslahti, E., *Cell* 1981. 26: 259.
- Colomer-Gould, V., Quintao, L. G., Keithly, J. and Nogueira, N., *J. Exp. Med.* 1985. 162: 902.
- Rice, C. M. and Strauss, J. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981. 78: 2062.
- Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. D., *Cell* 1986. 44: 517.
- Bordier, C., *Parasitol. Today* 1987. 50: 151.
- Gabius, H. J., Springer, W. R. and Barondes, S. H., *Cell* 1985. 42: 449.
- Ouaisi, M. A., Afchain, D., Capron, A. and Grimaud, J. A., *Nature* 1984. 308: 380.
- Peterson, D. S., Wrightsman, R. A. and Manning, J. E., *Nature* 1986. 322: 566.
- Keil-Dlouha, V. and Planchenault, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986. 83: 5377.
- Hautanen, A. and Oja-Keski, J., *Scand. J. Immunol.* 1980. 17: 225.
- Olson, M. O. J., Nagabhushan, N., Dzwiniel, M. and Smillie, L. B., *Nature* 1970. 228: 438.



Autorégulation de la croissance *in vitro* des Trypanosomatidæ

Au cours des dernières années, de nombreux auteurs se sont intéressés à l'étude des facteurs excrétés-sécrétés par les leishmanies; leurs caractérisations physico-chimiques, ainsi que leurs rôles dans les relations hôtes-parasites ont fait l'objet de nombreuses controverses.

Récemment, nous avons démontré que des parasites cultivés *in vitro* ne se multipliaient pas lorsque la densité de l'*inoculum* de départ était trop faible. Ces résultats semblaient indiquer que leur croissance dépendait d'une concentration minimale de métabolites soit excrétés-sécrétés par les parasites, ou métabolisés par eux à partir des composants du milieu de culture.

Le présent travail montre qu'un facteur de croissance produit par les leishmanies joue un rôle capital dans la régulation de la prolifération des parasites cultivés *in vitro*. L'activité de ce facteur, qui stimule la croissance à faibles concentrations puis l'inhibe à fortes doses, n'est pas spécifique d'espèce et s'étend à d'autres *Trypanosomatidæ*. Une fraction purifiée de poids moléculaire 70 kDa, non-dialysable et thermostable, obtenue par précipitation à l'éthanol de milieux conditionnés de parasites cultivés en absence de sérum dans du milieu LIT R9 (chimiquement défini) restaure les mêmes effets antagonistes dose-dépendants.

CONCLUSION

La présente étude montre, pour la première fois, que les promastigotes des leishmanies sécrètent dans leur milieu de culture un facteur capable de réguler leur croissance et dont l'activité s'étend à d'autres *Trypanosomatidæ*. La dose-dépendance de l'effet bifonctionnel engendré par ce facteur accrédite l'hypothèse d'une autorégulation de la croissance faisant intervenir un mécanisme de régulation négative ("Down regulation") par lequel les parasites contrôleraient leur multiplication. Cette activité régulatrice semble être restreinte à une glycoprotéine thermostable de p.m. 70 kDa.

Autorégulation de la croissance *in vitro* des Trypanosomatidae

Jean-Loup LEMESRE, Farrukh RIZVI, Ferruccio SANTORO, Marc LOYENS, Moyses
SADIGURSKY et André CAPRON

Résumé — Le présent travail montre qu'un facteur de croissance produit par les leishmanies joue un rôle capital dans la régulation de la prolifération des parasites cultivés *in vitro*. L'activité de ce facteur, qui stimule la croissance à faibles concentrations puis l'inhibe à fortes doses, n'est pas spécifique d'espèce et s'étend à d'autres *Trypanosomatidae*. La dose-dépendance de l'effet bifonctionnel engendré par ce facteur accreditte l'hypothèse d'une autorégulation de la croissance faisant intervenir un mécanisme de « down regulation » par lequel les parasites contrôleraient leur multiplication. Cette activité régulatrice semble être restreinte à une glycoprotéine thermostable de masse moléculaire 70 000.

Autocrine regulation of *Trypanosomatidae in vitro* growth

Abstract — In the present study, we report that a growth factor released by cultured *Leishmania* promastigotes plays a key role in the regulation of their growth *in vitro*. The factor stimulates growth at low concentrations but is inhibitory at high doses and these effects are not species-specific, also affecting other *Trypanosomatidae* growing *in vitro*. The dose-dependence of the bifunctional effect strongly supports the hypothesis of an autocrine growth regulation involving a negative feedback mechanism. The growth factor activity seemed to be supported by a heat-stable glycoprotein of 70,000 Mr.

Abridged English Version — *Leishmania* spp, a digenetic trypanosomatid protozoan, is an obligate intracellular parasite of mononuclear phagocytes transmitted by phlebotomine sandflies. Different *Leishmania* species are responsible for the cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis. The parasite cycles between a flagellated promastigote stage in the insect vector and a non-flagellated intracellular amastigote stage parasitizing the mammalian phagocytic cells. Differentiation into amastigotes occurs after surface attachment and entry of promastigotes into mononuclear phagocytes. The possibility of cultivating the promastigote *in vitro* allowed us to study the surface antigenic components [1] involved in the *Leishmania*-host cell interactions ([2]-[3]).

A number of investigators have described several excreted-secreted products from the promastigote ([4], [5], [6]) but their physico-chemical characterization and the role in the *Leishmania*-macrophage interactions still remain controversial [6].

In the present study, we describe that a growth factor released by the promastigotes during *in vitro* culture plays an important role in the regulation of their growth. We observed that the multiplication of the parasite was partially inhibited when the culture medium was changed daily (Fig. 1, A). This suggests a need of a conditional medium for the optimal growth of the parasites. The culture supernatants obtained from the logarithmic phase of culture produced an stimulating effect on the multiplication of promastigotes. However, the multiplication rate was considerably decreased by the culture supernatants obtained from the stationary phase.

The excreted-secreted components isolated from the culture medium stimulated the growth at very low concentrations and were inhibitory at high doses. Moreover, this effect was not pH dependent and was not species-specific, also affecting other *Trypanosomatidae* growing *in vitro* (Fig. 2, A and B). The dose-dependent and bifunctional effect suggests an autocrine

Note présentée par Jean DORST.

growth regulation involving a negative feedback mechanism by which the parasites would control their multiplication.

Several enriched fractions were prepared from the culture supernants for the identification and physico-chemical characterization of the components exhibiting the growth stimulation activity. The analysis of several fraction from the logarithmic and stationary phase cultures by SDS-PAGE permitted the identification of two molecules of apparent Mr 85,000-70,000 (Fig. 3). The heat treatment of these fractions suggested that the growth regulation activity was restricted to the heat-stable 70,000 Mr glycoprotein.

In conclusion, our studies demonstrate for the first time an excreted-secreted factor from *Leishmania* promastigotes capable of controlling their growth *in vitro*. The factor stimulating the growth at low concentrations shows an inhibitory effect at high concentrations. Therefore, the parasites seem to modulate their multiplication by means of a possible "Down regulation" mechanism. The biological relevance of this factor in the proliferation of parasites within the insect vector is yet to be defined. In addition, the utilization of this factor may be important in isolating the *Leishmania* strains directly from humans, which are sometimes difficult to maintain in cultures. Finally, our recent studies on the *Leishmania*-host cell interactions have described a sequential development of *Leishmania* promastigotes from a non-infective to infective stage ([2], [3]). Thus, the growth factors may facilitate parasite adherence to, and penetration into, the macrophages and could contribute to the protection of leishmaniae in the hostile activities of host cells.

INTRODUCTION. — Les leishmanies représentent un complexe de parasites protozoaires, responsables de certaines maladies cutanées, cutanéomuqueuses et viscérales chez l'homme et sont une cause importante de mortalité dans divers pays du tiers-monde.

Leur cycle évolutif comprend une forme flagellée, promastigotes, chez l'insecte vecteur (phlébotomes), et un stade non flagellé, les amastigotes qui parasitent obligatoirement les cellules phagocytaires mononucléées des mammifères. La possibilité de cultiver *in vitro* les promastigotes dans un milieu de culture monophasique acellulaire nous a permis d'entreprendre un certain nombre d'études à la fois biochimiques concernant leurs composants antigéniques de surface [1] et immunobiologiques en rapport avec les interactions leishmanies/macrophages ([2], [3]).

Au cours des dernières années, de nombreux auteurs se sont intéressés à l'étude des facteurs excrétés-sécrétés par les leishmanies ([4], [5], [6]) mais leurs caractérisations physico-chimiques, ainsi que leurs rôles dans les relations hôtes-parasites, ont fait l'objet de nombreuses controverses [6].

Récemment, nous avons démontré que des parasites cultivés *in vitro* ne se multipliaient pas lorsque la densité de l'*inoculum* de départ était trop faible [7]. Ces résultats semblaient indiquer que leur croissance dépendait d'une concentration minimale de métabolites soit excrétés-sécrétés par les parasites, ou métabolisés par eux à partir des composants du milieu de culture.

Le présent travail vise à montrer qu'un facteur de croissance d'origine parasitaire joue un rôle capital dans la régulation de la croissance des parasites *in vitro*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les promastigotes (10^5 et $5 \cdot 10^5$ par millilitre, respectivement) de *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/79/LI01) et de *L. braziliensis* (MHOM/BR/72/M1670) et $5 \cdot 10^5$ épimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (souche Téhuantepec) sont cultivés dans 3 ml de milieu monophasique LITR9 [8] neuf ou conditionné

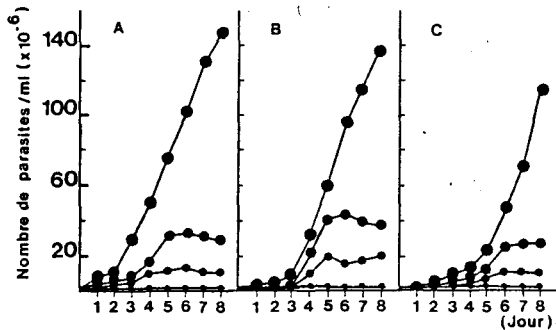


Fig. 1

Fig. 1. — Effets respectifs induits sur la croissance *in vitro* des promastigotes de *L. chagasi* (A), *L. braziliensis* (B) et des épimastigotes de *T. cruzi* (C), par des surnageants LITR9 d'une part non conditionnés (●—●) et d'autre part conditionnés respectivement par ces différents parasites en phase exponentielle (○—○) ou stationnaire (●—●) de leur croissance. Courbe de culture témoin (●—●).

Fig. 1. — Effects on the *in vitro* growth rate of promastigotes of *L. chagasi* (A), *L. braziliensis* (B) and of *T. cruzi* epimastigotes (C) by LITR9 supernatants either not conditioned (●—●) or conditioned by these various parasites in exponential (○—○) or stationary (●—●) culture phase. Standard culture curve (●—●).

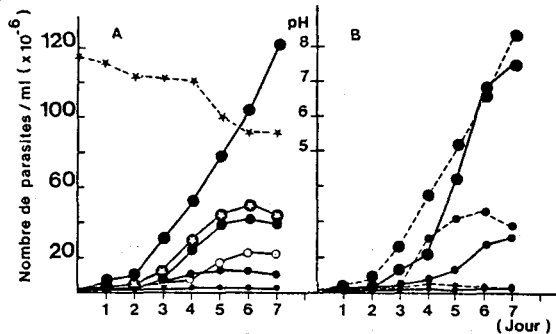


Fig. 2

Fig. 2. — (A) Influence du pH des milieux de culture sur la multiplication des promastigotes de *L. chagasi*. Effets résultant de la substitution quotidienne par des surnageants LITR9 neufs préalablement ajustés à pH 7 (●—●) ou pH 5,5 (○—○). En référence les activités stimulatrice et inhibitrice de la croissance respectivement induites par les milieux de phase logarithmique (●—●) et stationnaire (●—●) ou neufs (●—●). Courbe de culture témoin (●—●). Courbe de variation de pH au cours de la culture (★—★). (B) Extension de l'effet bifonctionnel des milieux conditionnés par *L. chagasi* à d'autres *Trypanosomatidae*. Les surnageants LITR9 conditionnés par des promastigotes de *L. chagasi* en phase exponentielle stimulent également la prolifération de *L. braziliensis* (●—●) et de *T. cruzi* (●—●). Ceux de phase stationnaire inhibent totalement leurs multiplications (●—● et ●—●). Courbes témoins correspondantes (●—● et ●—●).

Fig. 2. — (A) Influence of the pH of culture medium on multiplication of *L. chagasi* promastigotes. Effect of daily replacement by LITR9 supernatants previously adjusted to pH 7 (●—●) or pH 5.5 (○—○). For comparison are shown the stimulatory or inhibitory effects on growth of logarithmic phase (●—●), stationary phase (●—●) or new media (●—●). Standard culture curve (●—●). Curve of pH variation during the culture (★—★). (B) Extension of the bifunctional effect of *L. chagasi* conditioned media to other *Trypanosomatidae*. The LITR9 supernatants conditioned by *L. chagasi* promastigotes in exponential growth phase also stimulate the proliferation of *L. braziliensis* (●—●) and *T. cruzi* (●—●). Stationary phase media completely inhibit their proliferation (●—● and ●—●). Corresponding standard curves (●—● and ●—●) respectively.

(milieu chimiquement défini, exempt de sérum de veau fœtal). Ces concentrations parasitaires conduisent à des courbes de croissance très reproductibles avec les différentes phases de latence, exponentielle et stationnaire bien individualisées.

Au cours des différentes expériences de culture *in vitro*, la concentration parasitaire est journalièrement déterminée par comptage en cellule de Thoma des parasites préalablement fixés à la glutaraldéhyde (0,1% final). Des cultures de parasites ont été directement initiées dans les milieux LITR9, soit neufs ou préalablement conditionnés. Chaque jour, après centrifugation à 800 × g pendant 10 mn, les surnageants sont récoltés et les organismes resuspendus dans 3 ml du milieu qui a servi à initier la culture. Avant utilisation, les milieux conditionnés récoltés après centrifugation sont définitivement débarrassés de leurs parasites par filtration à travers une membrane millipore (0,22 μ). Les courbes de culture témoins sont obtenues lorsque les parasites sont cultivés classiquement dans le milieu LITR9, centrifugés (800 × g, 10 mn) et resuspendus chaque jour sans opérer de changement de surnageant de culture.

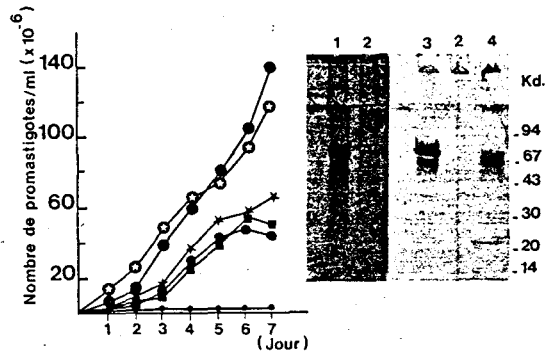


Fig. 3. — Dose-dépendance et caractérisation physico-chimique de l'activité « facteur de croissance ». Effet bifonctionnel sur la croissance de *L. chagasi* des fractions éthanol-insolubles et thermostables préparées à partir de surnageants LITR9 de phase exponentielle (●—●) et de phase stationnaire (●—●). Activités stimulatrices de la croissance de *L. chagasi* induites totalement ou partiellement par des milieux LITR9 conditionnés respectivement dilués au 1/10 (○—○) et au 1/100 (★—★). Promastigotes cultivés dans du milieu reconstitué avec la fraction éthanol-insoluble de surnageant LITR9 non conditionné (■—■). Courbe de culture témoin (●—●). Profils polypeptidiques des fractions éthanol-insolubles de phases exponentielle (profil 1) et stationnaire (profil 3) et de milieu neuf (profil 2) après analyse en gel de polyacrylamide-SDS. Fraction purifiée de phase exponentielle après traitement à la chaleur (profil 4).

Fig. 3. — Dose-dependance and physico-chemical characterization of the "growth factor" activity. Bifunctional effect on growth of *L. chagasi* by ethanol insoluble and thermostable fractions of exponential phase LITR9 supernatants (●—●) and of stationary phase supernatants (●—●). Stimulatory activity on *L. chagasi* growth of conditioned LITR9 medium diluted 1/10 (○—○) or 1/100 (★—★). Promastigotes grown in medium reconstituted with the ethanol-insoluble fraction of LITR9 supernatants (non-conditioned) (■—■). Standard culture curve (●—●). Polypeptide profile of ethanol-insoluble fraction of exponential phase (profile 1) and stationary phase (profile 3) supernatants and of fresh medium (profile 2) analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Purified fraction of exponential phase supernatant after heat-treatment (profile 4).

Des fractions enrichies de milieux LITR9 ont été préparées comme suit : des surnageants conditionnés ou non par des promastigotes de *L. chagasi* de 4 jours (phase logarithmique) ou de 6 jours (phase stationnaire) sont collectés par centrifugation et filtration à travers des membranes millipore (0,22 μ). Ils sont ensuite précipités par addition de 3 volumes d'éthanol pendant 4 h à -20°C . Après centrifugation, les culots sont lavés à l'éthanol, séchés, puis resuspendus dans de l'eau distillée. Les solutions sont alors dialysées une nuit, centrifugées et enfin lyophilisées ou préalablement traitées à la chaleur (100°C , 30 mn) avant centrifugation et lyophilisation.

Ces différentes fractions ont fait l'objet d'une analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide-SDS [9].

RÉSULTATS. — Comme le montre la figure 1A, la substitution quotidienne des milieux de culture par du milieu LITR9 neuf (●—●) inhibe partiellement la multiplication des promastigotes de *L. chagasi* comparativement à la courbe de culture témoin (●—●). Ce résultat suggère que la croissance des parasites *in vitro* nécessite impérativement des milieux de culture conditionnés. Le même type d'expérience utilisant cette fois des surnageants de culture conditionnés par des promastigotes de *L. chagasi* en phase exponentielle de croissance (4 jours) produisent un effet « facteur de croissance » spectaculaire sur la multiplication de *L. chagasi* (●—●). Les surnageants de culture de ces mêmes promastigotes, mais cette fois en phase stationnaire de la croissance (6 jours) inhibent par contre totalement la multiplication des parasites (●—●).

Par ailleurs, cet effet bifonctionnel engendré par les surnageants de culture conditionnés peut s'étendre à d'autres *Trypanosomatidae* : *L. braziliensis* (fig. 1B), agent responsable

de la leishmaniose cutanéomuqueuse et *T. cruzi* causant la maladie de Chagas (fig. 1C). Enfin, une étude plus détaillée de l'influence des milieux conditionnés sur la croissance parasitaire au cours de la culture de *L. chagasi*, démontre clairement qu'elle se restreint à deux effets antagonistes : une activité stimulatrice de la croissance qui s'accroît durant sa phase exponentielle du 2^e au 4^e jour) et un effet inhibiteur puissant à partir du 5^e jour de la culture (phase stationnaire).

Comme le montre la figure 2A, le pH des milieux décroît graduellement de 7,8 à 5,5 au cours de la culture parasitaire, atteignant une valeur voisine de la neutralité durant la phase logarithmique de la croissance (★---★). Il était donc important d'évaluer l'influence d'un tel paramètre, sachant qu'à pH neutre les activités métaboliques des promastigotes cultivés *in vitro* s'avèrent optimales [10]. Des expériences de substitution par des milieux LITR9 non conditionnés et préalablement ajustés à pH 7 (●—●) et 5,5 (○—○) respectivement ne modifient pas significativement le cours de la croissance des promastigotes de *L. chagasi* (fig. 2A). En aucun cas, ces résultats permettent d'expliquer l'effet bifonctionnel précédemment décrit.

La figure 2B montre que l'activité biologique du ou des facteur(s) régulant la croissance des promastigotes de *L. chagasi* n'est pas spécifique d'espèce et semble pouvoir se généraliser à d'autres *Trypanosomatidae* comme *L. braziliensis* (●----● et ●----●) ou *T. cruzi* (●—● et ●—●).

Afin de préciser les caractéristiques physico-chimiques d'une telle activité, plusieurs fractions enrichies ont été préparées à partir de surnageants LITR9 conditionnés et sélectionnées selon leur activité régulatrice de la croissance de *L. chagasi*. Reconstituées à leur concentration initiale dans du milieu neuf, des fractions purifiées, obtenues par précipitation à l'éthanol de milieux de phase exponentielle (●—●) et stationnaire (●—●) respectivement reproduisent après traitement à la chaleur (100°C, 30 mn) les mêmes effets antagonistes précédemment décrits (fig. 3). Il est important de souligner que cet effet bifonctionnel est dose-dépendant. En effet, après dilution (au 1/10) des milieux inhibiteurs, une stimulation de la croissance des promastigotes de *L. chagasi* analogue à celle induite par des surnageants de culture de phase exponentielle est observée (fig. 3, ●—●). Néanmoins, des concentrations plus faibles ne restaurent qu'une activité partielle (★—★).

Ces résultats accréditent l'hypothèse d'une autorégulation de la croissance faisant intervenir un mécanisme de « down regulation » par lequel les parasites contrôlèrent leur multiplication.

Il apparaît donc que l'activité bifonctionnelle de ce facteur de croissance parasitaire est contenue dans une fraction non dialysable, éthanol-insoluble et thermostable. L'analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide-SDS, dans des conditions réductrices, des fractions éthanol-insolubles de phase exponentielle (fig. 3, profil 1) et stationnaire (profil 3) révèlent des profils polypeptidiques analogues et relativement simples puisque deux bandes d'un poids moléculaire apparent de 85 000 et 70 000 daltons sont détectées. Leur coloration à la fois par le réactif de Schiff, le bleu de Coomassie et le nitrate d'argent indique qu'il s'agit de glycoprotéines. Enfin, le profil peptidique révélé par ces mêmes fractions traitées cette fois à la chaleur (fig. 3, profil 4) suggère que l'activité facteur de croissance semble restreinte à la glycoprotéine thermostable de masse moléculaire 70 000, la deuxième étant thermolabile.

DISCUSSION. — La présente étude montre, pour la première fois, que les promastigotes des leishmanies sécrètent dans leur milieu de culture un facteur capable de réguler leur

croissance et dont l'activité s'étend à d'autres *Trypanosomatidae*. Ce facteur qui stimule la croissance à faibles concentrations puis l'inhibe à fortes doses, joue ainsi un rôle essentiel dans le contrôle de la multiplication parasitaire. Cette activité autorégulatrice semble restreinte à une glycoprotéine thermostable de 70 000 daltons. Sa masse moléculaire et son taux élevé de synthèse pourraient logiquement lui conférer des propriétés immunogéniques. La relevance de ce facteur dans la modulation de la prolifération des parasites chez l'insecte vecteur reste à déterminer. La mise en évidence d'un ou de récepteur(s) spécifique(s) à la surface des parasites permettrait de clarifier la nature du mécanisme conduisant au déclenchement du cycle mitotique.

L'utilisation de ce facteur, et même plus simplement des surnageants de culture préalablement conditionnés par les parasites, devrait grandement faciliter l'adaptation en culture *in vitro* de souches directement isolées chez l'homme, souvent fastidieuse.

Enfin, de récentes études portant sur l'interaction des promastigotes de différentes espèces de leishmanies avec les macrophages, ont mis en évidence une corrélation très significative entre l'âge des promastigotes en culture et leur infectivité ([2], [3]). Il n'est donc pas interdit de penser que le facteur de croissance que nous venons de décrire puisse indirectement jouer un rôle important dans leur différenciation en un stade infectant.

Ce travail a reçu un support financier des Communautés Européennes et de la Rockefeller Foundation.

Nous remercions le Dr Le Ray d'avoir fourni la souche de *L. braziliensis* ainsi que M. Deslée et M^{me} Fourmaux pour leur précieux concours technique. Les auteurs remercient aussi Claudine Colson et Marie-France Massard pour leur travail de secrétariat.

Note reçue et acceptée le 7 mars 1988.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J.-L. LEMESRE, F. S. RIZVI, D. AFCHAIN, M. SADIGURSKY, A. CAPRON et F. SANTORO, *Infect. Immun.*, 50, 1985, p. 136-141.
- [2] M. KWEIDER, J.-L. LEMESRE, F. DARCY, J. P. KUSNIERZ, A. CAPRON et F. SANTORO, *J. Immunol.*, 138, 1987, p. 299-305.
- [3] F. SANTORO, J.-L. LEMESRE, F. S. RIZVI, M. SADIGURSKY et I. SHERLOCK, *I.N.S.E.R.M. Actualités*, numéro spécial « Projet France-Brazil », 1986, p. 18-20.
- [4] M. V. LONDNER, S. FRANKENBURG, G. M. SLUTZKY et C. L. GREENBLATT, *Parasite Immunol.*, 5, 1983, p. 249.
- [5] G. M. SLUTZKY, J. EL-ON et C. L. GREENBLATT, *Infect. Immun.*, 26, 1979, p. 916.
- [6] A. G. HERNANDEZ, *Cytopathology of parasitic diseases*, Pitman Books, London, 1983, p. 138.
- [7] J.-L. LEMESRE, F. DARCY, M. KWEIDER, A. CAPRON et F. SANTORO, *Acta Trop.*, 1987 (sous-presse).
- [8] M. SADIGURSKY et C. I. BRODSKIN, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35, 1986, p. 942.
- [9] U. K. LAEMMLI, *Nature*, 227, 1970, p. 680.
- [10] A. J. MUKKADA, J. C. GLASER et P. F. BONVENTRE, *Science*, 229, 1985, p. 1099.

J.-L. L., F. R., F. S., M. L. et A. C. : Centre d'Immunologie et de Biologie parasitaire,
Unité mixte I.N.S.E.R.M. U167-C.N.R.S. 624,
Institut Pasteur, 1, rue du Professeur-Calmette, 59019 Lille Cedex;

J.-L. L. : Adresse actuelle : O.R.S.T.O.M., B.P. n° 181, Brazzaville, R. P. du Congo;

M. S. : Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, F.I.O.C.R.U.Z./U.F.B.A., 40000 Salvador, Bahia, Brazil.

If a definition is helpful in the understanding of a biological process, it is worthwhile, but it should never be allowed to channel or limit ones's ideas.

DISCUSSION

DISCUSSION

Le contrôle immunologique des maladies parasitaires en raison-même de la complexité des interactions entre le parasite et son hôte vertébré nécessite à l'évidence l'étude détaillée des paramètres immunologiques de ce couple dont la survie appelle nécessairement une tolérance réciproque. A cet égard, et quelque soit le haut degré de sophistication des approches immunochimiques ou de biologie moléculaire, toute tentative de vaccination doit être précédée non seulement par l'identification précise des antigènes cibles de l'immunité mais aussi par celle des mécanismes de survie mis en place par le parasite qui peuvent annihiler complètement les effets protecteurs escomptés. Les solutions biologiques originales développées par les divers parasites pour s'adapter et survivre chez leur hôte immunocompétent rendent compte des particularités de l'immunologie parasitaire dont les points essentiels apparaissent être, d'une part une modulation de l'antigénicité et l'excrétion/sécrétion d'antigènes circulants, d'autre part une sélection apparente de certains types de réponses immunitaires effectrices, avec isotypie préférentielle des réponses anticorps et rôles privilégiés de mécanismes de cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendants originaux. Les molécules d'hôte ayant des propriétés immunorégulatrices potentielles acquises par le parasite dans cette sélection compliquent singulièrement toute stratégie de recherche en vue d'une vaccination. Ainsi, l'immunisation doit être envisager non pas au niveau global de l'antigène cible potentiel, mais de l'épitope protecteur en l'absence d'épitope capable d'induire une réponse bloquante indésirable. La caractérisation et la production par méthode de génie génétique ou synthèse peptidique, d'antigènes fonctionnels représente indiscutablement un progrès essentiel dans la démarche expérimentale vers la vaccination efficace dans les parasitoses.

L'interaction de *Leishmania* avec la cellule hôte passe successivement par les étapes suivants: (a) l'attachement du promastigote à la surface des macrophages, (b) la pénétration dans les macrophages, (c) la transformation intracellulaire en amastigotes et (d) la réinfection des macrophages par des amastigotes. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'attachement des promastigotes aux macrophages afin de développer les moyens pour bloquer l'invasion des cellules par le parasite. Plusieurs récepteurs présents sur la membrane plasmique des macrophages semblent impliqués dans l'attachement des promastigotes: le récepteur de type lectine spécifique du mannose, du fucose et de la GlcNAc et le récepteur CR3 spécifique du composant C3bi du complément. D'autre part, plusieurs molécules de la membrane des

promastigotes ont été décrites comme étant des ligands de ces récepteurs: une glycoprotéine de 63kDa riche en mannose est capable de lier le composant C3b du complément, et un glycolipide dont la fixation est inhibée par un anticorps monoclonal anti-CR3. Les récepteurs et les ligands qui sont impliqués dans la fixation et la phagocytose des amastigotes restent à étudier, mais des expériences récentes semblent indiquer qu'ils sont en partie différents de ceux utilisés par les promastigotes.

Comme dans le paludisme et la toxoplasmose, les sujets infectés par *Leishmania* conservent en général une protection contre la réinfection. Des travaux récents ont suggéré un rôle des antigènes de surface des promastigotes dans cette protection. Dans un premier temps nous avons étudié les antigènes du surface de certaines espèces de leishmanies en utilisant la méthode de radiomarquage. Les protéines de surface, marquées à l'iode 125, des promastigotes de *Leishmania donovani*, *L. chagasi* et *L. infantum* ont été analysées en gel de polyacrylamide-SDS.

L'analyse comparative de molécules de surface des trois espèces a révélé une grande similitude entre *L. chagasi* et *L. donovani*. La protéine majeure de 50 kDa, observée à la surface de *L. chagasi* et *L. donovani*, est absente de la surface de *L. infantum*. Par contre cette dernière exprime d'une façon majeure en surface, un doublet de protéines d'un poids moléculaire apparent de 25-23 kDa.

Les sérums de souris immunisées avec des promastigotes et les anticorps monoclonaux produits contre *L. chagasi* et *L. donovani*, montrent, en immunofluorescence indirecte, la même discordance au niveau de ces espèces, à savoir que les anticorps dirigés contre *L. chagasi* reconnaissent de la même façon la surface de *L. donovani*, et réciproquement. Par contre, les immunosérums anti-*L. infantum* ne reconnaissent que les formes de culture homologues.

Des expériences d'immunoprécipitation, à l'aide de sérums de patients atteints de Kala-azar et de sérums de lapins immunisés soit avec *L. infantum* ou *L. chagasi*, également confirment les différences antigéniques de surface observées entre ces sous-espèces. Cependant, les études isoenzymatiques réalisées ne semblent pas indiquer une telle divergence. Néanmoins, nos expériences d'immunoprécipitation montrent qu'il existe une grande similitude dans la structure moléculaire de ces trois espèces, mais que l'expression de surface de certaines protéines semble différente. Ces résultats peuvent être considérés dans le contexte

des problèmes taxonomiques particulièrement complexes. Les antigènes spécifiques des différentes espèces pourront être intégrées à la panoplie des critères d'identification et de taxonomie des *Leishmania*. D'autre part la spécificité antigénique pourrait expliquer la grande diversité des hôtes définitifs et des vecteurs, ainsi que leur distribution géographique. De plus, les antigènes spécifiques d'espèces pourraient jouer un rôle dans l'immunité contre la leishmaniose.

Nous avons ensuite envisagé le développement d'un modèle *in vitro* d'interaction des promastigotes de leishmanies avec leur cellule hôte. L'ensemble des travaux effectués montrent que l'infectivité des promastigotes de diverses espèces de *Leishmania* est en rapport avec leur stade évolutif en culture; les promastigotes en phase stationnaire (5 jours) sont, en effet, beaucoup plus infectieux vis-à-vis des macrophages péritonéaux de souris BALB/C *in vitro* que ceux en phase exponentielle (3 jours). Par ailleurs, en utilisant des techniques radioimmunologiques et d'immunofluorescence indirecte avec des sérums de souris immunisées avec les formes de 3 jours ou 5 jours, nous avons démontré que l'expression antigénique de surface des promastigotes infectieux est différente de ceux non-infectieux. Les anticorps polyclonaux anti-promastigote de 5 jours réagissent également avec les promastigotes obtenus à partir de l'insecte vecteur (Phlébotomes). Ces résultats indiquent que de nouvelles molécules immunogènes apparaissent en même temps que les promastigotes deviennent infectieux. D'autre part, ils mettent en évidence des similitudes antigéniques entre les promastigotes de culture en phase stationnaire et ceux des phlébotomes qui présentent la même infectivité. Ces nouveaux antigènes qui sont exprimés à la surface des promastigotes infectieux, pourraient jouer un rôle important dans les interactions parasites-macrophages.

Pour étudier le rôle des antigènes de surface, une batterie d'anticorps monoclonaux et polyclonaux a été produite vis-à-vis de la surface des promastigotes de *L. chagasi*, *L. donovani* et *L. braziliensis*. Les interactions leishmanies-macrophages ont été étudiées avec des promastigotes de culture de trois espèces de *Leishmania* et des macrophages péritonéaux de souris BALB/C. Dans tous les cas, une corrélation très significative a été mise en évidence entre l'âge des promastigotes en culture et leur infectivité vis-à-vis des macrophages. Il apparaît que l'infectivité de *L. chagasi* est associée à l'apparition de néoantigènes de 63 kDa (gp63) à la surface des promastigotes. Dans le modèle *L. braziliensis*, une relation très significative a été observée entre l'âge des promastigotes, leur infectivité et l'expression

croissante d'au moins un épitope de surface reconnu par un anticorps monoclonal sur gp63.

Ainsi, les promastigotes de *L. chagasi* subissent, au cours des cultures, une différenciation qui se traduit par des modifications de l'infectivité et de l'expression antigénique de surface des parasites. Le but de ce travail a été de rechercher, à l'aide de la cytométrie de flux, un critère caractéristique de cette différenciation.

Nos résultats, très reproductibles d'une culture à l'autre, montrent en fonction de l'âge des cultures, une modification importante du maximum des histogrammes obtenus par le "forward scatter", ou diffusion aux petits angles du faisceau laser utilisé dans cette technique. Ce paramètre, qui reflète vraisemblablement l'indice de réfraction des parasites, atteint en effet un pic de l'ordre de 1000, une vingtaine d'heures après le repiquage des cultures, décroît très vite et atteint un plateau inférieur de valeur 100 lorsque les parasites sont en phase stationnaire. Il semble donc que le "forward scatter" constitue bien un critère quantitatif de différenciation des promastigotes en phase exponentielle ou stationnaire.

Nos observations tout à fait originales sont évidemment difficiles à interpréter. S'il est généralement admis que le cône d'ombre reflète la taille et la forme des particules, dans le cas du "Forward scatter" de nombreux paramètres peuvent intervenir. Il semble que, dans le cas présent, les variations de ce paramètre traduisent principalement les modifications de l'indice de réfraction, qui traduiraient des modifications internes des parasites; en effet, le "Forward scatter" est très élevé dans le cas de populations homogènes de parasites très condensés, et une valeur beaucoup plus basse dans le cas de promastigotes vacuolisés et beaucoup moins réfringents.

Ce paramètre semble donc constituer un véritable marqueur de différenciation des promastigotes en culture. Toute l'originalité de cette étude réside dans le fait que ce nouveau critère de différenciation peut également jouer le rôle de marqueur d'infectivité des promastigotes de *L. chagasi*.

Ce travail a été complété en parallèle par des études morphologiques des promastigotes en microscopie optique après coloration de Giemsa, en microscopie électronique classique et en cryodécoupage. Cette étude n'a pas permis de mettre en évidence de différences notables au cours de la maturation des promastigotes; ceci nous montre que même si la nature biochimique de ses composants varie, l'ultrastructure de la membrane plasmique des promastigotes reste constante.

Les phagocytes mononucléés possèdent à la surface de leur membrane plasmique des récepteurs pour la fibronectine, une glycoprotéine de haut poids moléculaire qui est un constituant majeur de la matrice extracellulaire et qui est également synthétisée par ces cellules.

Des anticorps polyclonaux anti-Fn obtenus chez le lapin précipitent deux molécules de p.m. apparent de 63 et 58 kDa à partir de lysats NP-40 de promastigotes de *L. chagasi* marqués en surface à l'¹²⁵I. Les antisérums réagissent également avec la surface de promastigotes fixés ou vivants, ceci en test d'immunofluorescence indirecte. Des résultats identiques sont obtenus avec un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule de Fn (M1205).

Puisque la capacité de la Fn à se lier aux cellules peut être attribuée au térapeptide RGDS (séquence qui est une partie du domaine d'attachement cellulaire de la Fn) nous avons utilisé les peptides synthétiques contenant la séquence RGDS pour inhiber la fixation d'anticorps anti-Fn sur la gp63 en immunoprécipitation.

Un de ces trois peptides contenant la séquence RGDS inhibe efficacement la précipitation de la gp63 par des anticorps anti-Fn. Un peptide n'ayant aucune homologie avec RGDS n'est pas efficace. Ceci indique donc clairement que le domaine de la gp63 fixant des anticorps anti-Fn est similaire à celui de la Fn.

De plus, un anticorps monoclonal le 3E3 dirigé contre un fragment de 15 kDa de la Fn contenant la séquence RGDS ainsi que plusieurs anticorps polyclonaux monospécifiques obtenus chez la souris et dirigés contre le peptide synthétique RGDS reconnaissent également le complexe 63-58 précités à la surface du promastigote.

Dans certaines expériences, un composant de haut poids moléculaire (200 kDa) est également reconnu par les deux anticorps monoclonaux et polyclonaux à la surface de promastigotes radiomarqués. Ce composant pourrait correspondre à la Fn du milieu de culture adsorbée à la surface du promastigote, et qui avait également été marquée à l'I¹²⁵. Afin de confirmer l'origine parasitaire du complexe 63-58, nous avons effectué un marquage métabolique des parasites à la méthionine ³⁵S et les lysats ont été immunoprécipités avec différents anticorps. Nous avons constaté que les bandes (gp63 et 58) sont d'origine parasitaire et que la réaction est inhibée par des peptides synthétiques contenant la séquence RGDS. Une deuxième confirmation a été obtenue lors d'immunoprécipitation de produits de traduction d'ARN messager de promastigotes avec les mêmes anticorps. Ces expériences nous

ont permis de plus d'estimer à 52 kDa le poids moléculaire du corps peptidique du complexe gp63-58.

L'ensemble de ces résultats nous conduisent à penser que la séquence RGDS est portée par ce complexe majeur antigénique. Des expériences d'inhibition d'invasion des macrophages par les parasites ont été également réalisées, nous avons observé que le traitement préalable des promastigotes par des F(ab)'2 d'IgG anti-Fn ou la saturation des récepteurs Fn des macrophages par du RGDS, inhibe l'infection des cellules par le parasite. Ces résultats plaident également en faveur de l'interaction du complexe gp63-58 avec le récepteur Fn du macrophage par le biais de la séquence RGDS.

L'ensemble des résultats indiquent clairement que le complexe gp63-58 possède plusieurs propriétés en commun avec la Fn. La molécule de 58 kDa copécipitée avec celle de 63 kDa a été décrite par certains auteurs comme étant un produit de la 63 qui aurait subi une dénaturation incomplète des groupes sulfhydroxyles. La séquence RGDS a été trouvée dans des protéines de plusieurs organismes primitifs. Les récepteurs de *E. coli*, la protéine lambda B, la protéine du virus de Sindbis, contiennent une séquence RGDS mais ne possèdent pas d'autres homologies détectables avec la Fn. La présence de la séquence RGDS dans le virus de la Fièvre jaune, le virus de la Fièvre aphteuse et le virus de l'influenza A permet l'entrée des virus dans les cellules hôtes par l'intermédiaire des récepteurs RGD cellulaires. Parmi la longue liste des mécanismes de récepteurs-ligands décrits pour les espèces de leishmanies, nos résultats conduisent à formuler l'hypothèse suivante: le promastigote peut se fixer au récepteur Fn des cellules mononucléées, ceci grâce à la séquence RGDS de sa gp63.

Comme la Fn, la gp63 peut également se polymériser soit en réagissant avec elle-même, soit avec des molécules de Fn. En effet, le passage d'un extrait de promastigote sur une colonne de gel filtration permet la purification d'une molécule de 400 kDa (6 x 63). La masse moléculaire déterminée par spectrométrie de masse indiquent que la molécule est un dimère formé de 2 sous unités de 63. L'hypothèse ci-dessous peut être renforcée par le fait que l'expression de la gp63 est augmentée quand les promastigotes entrent en phase stationnaire et deviennent infectieux. A ce stade les parasites forment des rosettes qui peuvent être facilement observés en microscopie optique. La séquence RGD joue également un rôle dans le phénomène d'agrégation de *Dictyostelium discoïdeum*. En effet, la moisissure existe à l'état unicellulaire pendant son repas bactérien, mais se différencie en un stage agrégé lorsque le

milieu nutritif s'appauvrit.

La gp63 possède d'autres propriétés biologiques qui sont exprimées par la molécule de Fn, notamment une activité protéolytique. En effet, la gp63 est une protéase qui peut hydrolyser la sérum albumine bovine (BSA) et se fixe aux récepteurs des protéases du macrophages. De même, la gp63 fixée sur une surface solide permet l'adhérence et l'étalement des fibroblastes tout comme de nombreuses protéines, le collagène, le fibrinogène, la thrombine etc. qui contiennent la séquence RGD et possèdent la même capacité que la Fn pour réagir avec les surfaces cellulaires.

Nous avons également démontré que des parasites cultivés *in vitro* ne se multipliaient pas lorsque la densité de l'*inoculum* de départ était trop faible. Ces résultats semblaient indiquer que leur croissance dépendait d'une concentration minimale de métabolites soit excrétés-sécrétés par les parasites, ou métabolisés par eux à partir des composants du milieu de culture. Nous avons ainsi identifié un facteur de croissance produit par les leishmanies qui joue un rôle capital dans la régulation de la prolifération des parasites cultivés *in vitro*. L'activité de ce facteur, qui stimule la croissance à faibles concentrations puis l'inhibe à fortes doses, n'est pas spécifique d'espèce et s'étend à d'autres *Trypanosomatidæ*. Il s'agit, en fait, d'une glycoprotéine d'environ 70 kDa, thermostable à 100°C pendant 1 heure et soluble dans de l'acide trichloracétique. A des faibles doses, elle amplifie la croissance des parasites, mais, à des doses plus fortes, elle transforme très rapidement (4 heures environ) des promastigotes en phase logarithmique (3 jours) en formes infectantes (phase stationnaire). Nos études montrent, pour la première fois, que les promastigotes des leishmanies sécrètent dans leur milieu de culture un facteur capable de réguler leur croissance. La dose-dépendance de l'effet bifonctionnel engendré par ce facteur accrédite l'hypothèse d'une autorégulation de la croissance faisant intervenir un mécanisme de régulation négative ("Down regulation") par lequel les parasites contrôlèrent leur multiplication.

L'ensemble des travaux réalisés dans les leishmanioses ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- a. Des antigènes spécifiques de sous-espèces sont présentés à la surface des promastigotes du complexe *L. donovani*. Ceci pourrait être en rapport avec l'absence d'immunité croisée fréquemment observée entre les diverses leishmanioses.

- b. Le développement séquentiel des promastigotes d'un stade non infectant vers un stade infectant a été démontré dans diverses espèces de *Leishmania*. La génération des formes infectantes est en rapport avec l'âge des parasites en culture et restreinte aux promastigotes de phase stationnaire.
- c. L'expression croissante de certains épitopes ou de nouveaux antigènes (gp63) à la surface des promastigotes infectants est en rapport avec leur infectivité.
- d. Des changements morphologiques observés par cytométrie de flux accompagnent le développement des promastigotes infectants.
- e. Une glycoprotéine de 70 kDa excrétée par les promastigotes en culture est capable de contrôler la croissance des parasites.
- f. Les antigènes spécifiques des promastigotes infectants semblent jouer un rôle important dans la différenciation et la survie des leishmanies dans les macrophages. Ils représentent des candidats potentiels pour le développement de vaccins contre les leishmanioses.
- g. La partie protéique du complexe antigénique majeur de surface: gp63-58, contient des déterminants antigéniques communs avec ceux de la fibronectine et suggère un nouveau modèle expliquant cette étape d'adhésion : le complexe gp63-58 se fixe aux récepteurs Fn des macrophages (Figure 4). Le domaine de la Fn qui se fixe aux récepteurs cellulaires contient une petite séquence de quatre acides aminés, Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS). En utilisant des anticorps monoclonaux dirigés vis-à-vis de ce domaine et des peptides synthétiques contenant la séquence RGDS, nous avons obtenu la preuve indirecte de l'existence d'une telle structure dans le complexe gp63-58. Récemment le clonage et le séquençage d'une partie de la gp63 a confirmé la présence de la séquence RGD dans cette protéine.

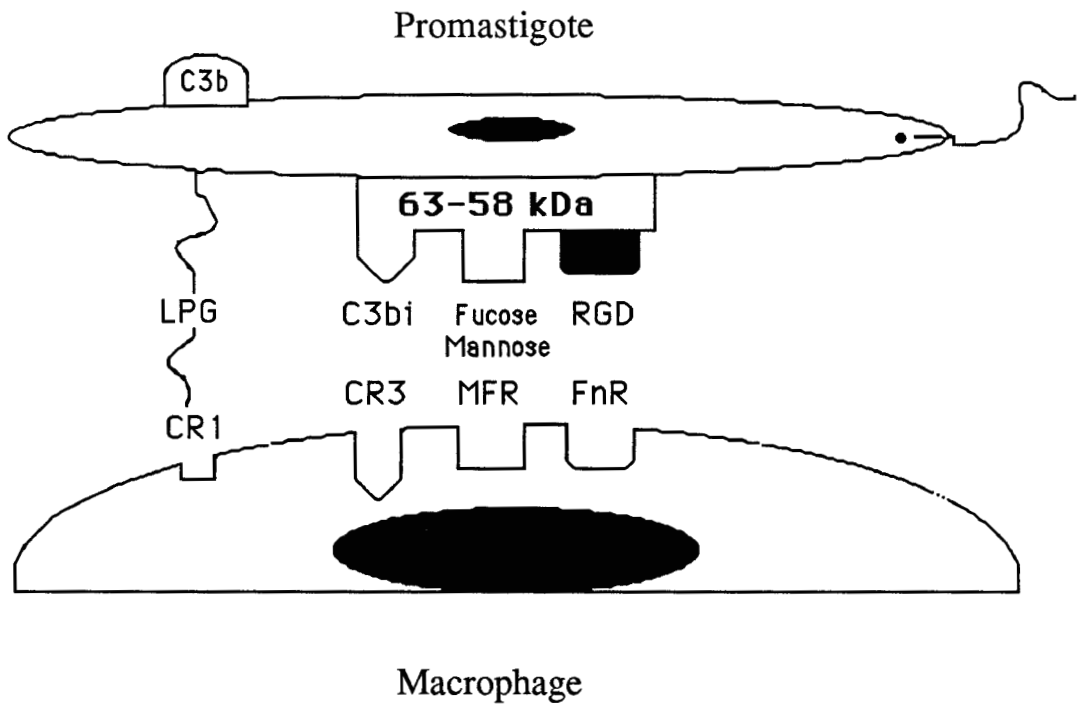


Figure 4: Modèle d'attachement de *Leishmania* à la cellule hôte.

L'interaction du promastigote avec le macrophage se fait par l'intermédiaire de nombreux mécanismes décrits dans le chapitre des généralités. Il est difficile de s'assurer si l'attachement du parasite se fait par l'intermédiaire de la Fn, du C3bi ou de la gp63 puisque tout ces ligands contiennent la séquence RGD et sont présents à la surface du parasite. Dans une étude récente Russell & Wright (1988) ont démontré que la gp63 se fixe directement au récepteur CR3 du macrophage par le biais de la séquence RGD présente dans la molécule. Les expériences qui ont été réalisées montrent que l'attachement des billes recouvertes de gp63 purifiée peut être inhibée par des peptides de la gp63 contenant la séquence RGD mais non avec ceux synthétisés à partir de la séquence de Fn. Par contre, nos résultats suggèrent fortement la participation du récepteur Fn. En effet, nos expériences montrent que des anticorps anti-Fn bloquent l'attachement des promastigotes aux macrophages. Cette inhibition est également obtenue par saturation des récepteurs Fn du macrophage par des peptides contenant la séquence RGD. Cette discordance entre nos résultats et ceux de David Russell pourrait être due en fait de ce que nous utilisons des promastigotes entiers alors que Russell travaille avec la gp63 purifiée, fixée sur un support solide ce qui pourrait modifier sa conformation.

Bien que la Fn semble jouer un rôle important dans l'interaction de divers agents pathogènes avec leur cellules hôtes par le biais de sa séquence RGD (Ouaissi, 1988), ceci n'exclut pas un rôle possible pour d'autres molécules d'adhésion comme la laminine, la chondrionectine, le collagène ou la thrombospondine. Par ailleurs, d'autres travaux suggèrent que la Fn peut moduler la fonction d'autres récepteurs de surface. Par exemple, il est admis que les récepteurs pour le complément C3 existent sur deux formes: une forme active (C3b) où les récepteurs permettent la phagocytose et une forme inactive (C3bi). Dans le cas des macrophages humains l'interaction de la Fn avec les récepteurs présents à la surface des macrophages induit la phagocytose des particules recouvertes de C3b ou C3bi par le biais des récepteurs CR1 et CR3. Ces observations suggèrent que des transductions de signaux par les récepteurs du complément peuvent être régulées par la Fn exogène. Des observations similaires ont été obtenues dans le modèle de *T. cruzi*. En effet, Cornette *et al.* (1988) ont montré que la Fn exogène amplifie la phagocytose des formes epimastigotes de *T. cruzi* recouvertes de C3 par les monocytes et les neutrophiles. Ceci suggère l'existence d'un effet coopératif entre les récepteurs Fn, CR1 et/ou CR3 dans ce phénomène de phagocytose.

Il est donc probable que dans le cas de l'interaction entre le promastigote et le macrophage, plusieurs couples de ligands-récepteurs peuvent être mis en jeu: la gp63 et les récepteurs CR3 et/ou Fn, le C3b couplé au LPG du promastigote et les récepteurs CR1, et les antigènes contenant le fucose-mannose et les récepteurs MFR.

Les expériences *in vivo* ne sont pas encore assez convaincantes quant à l'utilisation de la gp63 pour une éventuelle vaccination contre les leishmanioses, bien que l'immunisation de souris par la gp63 incorporée dans les liposomes ait pu les protéger contre *L. mexicana* (Russell & Alexander, 1988). En effet, une grande prudence s'impose puisque les antigènes parasitaires (qu'on suppose être des candidats à la vaccination) contiennent parfois des séquences homologues à celles retrouvées dans certaines protéines de l'hôte vertébré. Ceci est le cas de gp63. L'utilisation de ces antigènes communs peut induire l'apparition d'anticorps dirigés vis-à-vis de structures du soi. De même, si l'on tient compte de la théorie du réseau idiotypique, l'immunisation avec des antigènes parasitaires qui se fixent aux récepteurs cellulaires du fait qu'ils contiennent des séquences homologues à celles du ligand naturel, peut induire l'apparition d'anticorps Ab2 qui seraient des images internes de l'antigène, par conséquent, pourraient se fixer aux récepteurs cellulaires (Ouaissi & Capron, 1988).

Le vaccin idéal ne doit pas être toxique pour l'hôte vacciné ni induire des processus autoimmuns. On peut envisager l'immunisation d'animaux avec un peptide de la gp63 présentant ou ne présentant pas la séquence RGD. Cela permettrait dans un premier temps d'étudier la nécessité de la présence de cette séquence dans la protection contre la leishmaniose.

It is not given to any one man, however, endowed, to rise spontaneously into intellectual splendor without the percentage of antecedent thought.

John Tyndall.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AIKAWA, M., HENDRICKS, L. D., ITO, Y. & JAGUSIAK, M. (1982). Interactions between macrophage like cells and *Leishmania braziliensis* *in vitro*. *Am. J. Path.*, **108**:50-59.
2. ALEXANDER, J. & VICKERMAN, K. (1975). Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *J. Protozool.*, **22**:502-508.
3. ALEXANDER, J. & RUSSELL, D. G. (1985). Parasite antigens, their role in protection, diagnosis and escape: the leishmaniasis. *In Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol. 120. R. M. E. Parkhouse, ed. *Springer-Verlag*, Berlin, P. 43.
4. ALVING, C. R. (1977). Immune reactions of lipids and lipid model membranes. *In The Antigens*, M. Sela, ed., *Academic Press*, New York, **4**:1-72.
5. AYESTA, C., ARGUELLO, C., HERNANDEZ, A. G. (1985). *Leishmania braziliensis*: Cell surface differences in promastigotes of pathogenic and non-pathogenic strains. *Exp. Parasitol.*, **59**:185-191.
6. BELLER, D. I., SPRINGER, T. A. & SCHREIBER, R. D. (1982). Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. *J. Exp. Med.*, **156**:1000-1009.
7. BERGER, E. A., & ARMANT, D. R. (1982). Discoidins I and II. Common and unique regions on two lectins implicated in cell-cell cohesion in *Dictyostelium discoïdeum*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **79**:2162-2166.

8. BERMAN, D. J., DWYER, D. M. & WYLER, D. J. (1979). Multiplication of *Leishmania* in human macrophages *in vitro*. *Infect. Immun.*, **26**:375-379.
9. BERTON, G. & GORDON, S. (1983). Modulation of macrophage mannosyl-specific receptors by cultivation on immobilized zymosan. Effects on superoxide-anion release and phagocytosis. *Immunology*, **49**:705-715.
10. BLACKWELL, J. M. (1985). Receptors and recognition mechanism of *Leishmania* species. *Trans. R. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, **79**:606-612.
11. BLACKWELL, J. M., EZEKOWITZ, R. A. B., ROBERTS, M. B., CHANNON, J. Y., SIM, R. A. B. & GORDON, S. (1985b). Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *J. Exp. Med.*, **162**:324-331.
12. BORDIER, C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114. *J. Biol. Chem.*, **256**:1604-1607.
13. BOUVIER, J. (1987). Identification of the promastigote surface protease in seven species of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **24**:73-79.
14. BUTTON, L. L. & McMASTER, W. R. (1988). Molecular cloning of the major surface antigen of *Leishmania*. *J. Exp. Med.*, **167**:724-729.
15. BRAY, R. S. (1974). *Leishmania*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **28**:189-217.
16. CHANCE, M. L. & WALTON, B. C. (1980). eds. Biochemical Characterization of *Leishmania*. UNDP/ World Bank/WHO, Geneva, pp 280.
17. CHANG, K-P. & DWYER, D. M. (1976). Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosome of hamster macrophages *in vitro*. *Science*, **193**:678-680.

18. CHANG, K-P. & DWYER, D. M. (1978). *Leishmania donovani* : hamster macrophage interactions *in vitro*. Cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes. *J. Exp. Med.*, **147**:515-530.
19. CHANG, K-P. & FONG, D. (1982). Antigenic changes during intracellular differentiation of *Leishmania mexicana* in cultured macrophages. *Infect. Immun.*, **36**:430-431.
20. CHANG, K-P. & FONG, D. (1983). Cell biology of host-parasite membrane interactions in leishmaniasis. *In* Cytopathology of Parasitic Disease. Ciba Foundation Symposium. *Pitman Books*, London, **99**:113-137.
21. CHANG, C. S. & 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**:100-104.
22. 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**:197-210.
23. CHANNON, J. Y., ROBERTS, M. B. & BLACKWELL, J. M. (1984). A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunology*, **53**:345-355.
24. CHAUDHURI, G. & CHANG, K-P. (1988). Acide protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **27**:43-52.

25. CHOROMANSKI, L., HONIGBERG, B. M. & HONHON, P. M. (1984). *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* : analysis by fluorecein-conjugated plant lectins of surface saccharides of cloned variant antigen types differing in infectivity for mice. *J. Parasitol.*, **70**:634-643.
26. CORNETTE, J., CAPRON, A. & OUAISSI, M. A. (1988). *Trypanosoma cruzi*: Fibronectin promotes uptake of epimastigote culture forms by human neutrophils and monocytes. *Int. Archs Allergy appl. Immun.*, **86**:139-146.
27. CZOP, J. K., KADISH, J. L. & AUSTEN, F. (1981). Augmentation of human monocyte opsonin-independent phagocytosis by fragments of human plasma fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **78**:3649-3653.
28. DA SILVA, R. P., HALL, B. F., JOINER, K. A. & SACKS, D. L. (1988). CR1 mediates binding of *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *Ann. Inst. Oswaldo Cruz*, **83**:459-463.
29. DATTA, A. & MAJUMDAR, H. K. (1986). Effect of monosaccharides on uptake of *Leishmania donovani* promastigotes by murine macrophages. *Ind. J. Biochem. Biophys.*, **23**:1-4.
30. DE IBARRA, A. A. L., HOWARD, J. G. & SNARY, D. (1982). Monoclonal antibodies to *Leishmania tropica major*: specificities and antigen location. *Parasitology*, **85**:523-531.
31. DEVINE, D. V., FALF, R. J. & BALBER, A. E. (1986). Restriction of the alternative pathway of human complement by intact *Trypanosoma brucei* subsp. *gambiense*. *Infect. Immun.*, **52**:223-229.
32. DORAN, T. I. & HERMAN, R. (1981). Characterization of populations of promastigotes of *Leishmania donovani*. *J. Protozool.*, **28**:345-350.

33. DWYER, D. M. (1974). Lectin binding saccharides on a parasitic protozoan. *Science*, **184**:471-473.
34. DWYER, D. M. (1977). *Leishmania donovani*: Surface membrane carbohydrates of promastigotes. *Exp. Parasitol.*, **41**:341-358.
35. DWYER, D. M. & GOTTLIEB, M. (1983). The surface membrane chemistry of *Leishmania* : its possible role in parasite sequestration and survival. *J. Cell. Biochem.*, **23**:35-45.
36. EBRAHIMZADEH, A. & JONES, T. C. (1983). A comparative study of different *Leishmania tropica* isolates from Iran: Correlation between infectivity and cytochemical properties. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **32**:694-702.
37. ETGES, R. J., BOUVIER, J., HOFFMAN, R. & BORDIER, C. (1985). Evidence that the major surface proteins of three *Leishmania* species are structurally related. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **14**:141-149.
38. EZEKOWITZ, R. A. B., SIM, R. B., HILL, M. & GORDON, S. (1984). Local opsonization by secreted macrophage complement components. Role of receptors for complement in uptake of zymosan. *J. Exp. Med.*, **159**:244-260.
39. FISCHER, E., OUAISSI, M. A., VELGE, P., CORNETTE, J. & KAZATCHKINE, M. D. (1988). gp58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. *Immunology*, **65**:299-303.
40. FLOTTE, T. J., SPRINGER, T. A. & THORBECKE, G. J. (1982). Dendritic cell and macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal sheets. *Am. J. Path.*, **111**:112-124.

41. FONG, D. & CHANG, K-P. (1982). Surface antigenic changes during differentiation of a parasite protozoan, *Leishmania mexicana*:: identification by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **79**:7366-7370.
42. FRAKER, P. J. & SPECK, J. C. (1978). Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloroamide, 1, 3, 4, 6-tetrachloro-3 α , 6 α -diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**:849-857.
43. FRANKE, E. D., MCGREEVY, P. B., KATZ, S. P. & SACKS, D. L. (1985). Growth cycle dependent generation of complement resistant *Leishmania promastigotes*. *J. Immunol.*, **134**:2713-2714.
44. FRANKENBERG, S., SLUTZKY, G. M., GITLER, C. & LONDNER, M. V. (1984). Lipid antigens from *Plasmodium berghei*-infected erythrocytes. *Z. Parasitenkde.*, **70**:331-336.
45. FROTHINGHAM, T. E. & LEHTIMAKI, E. (1969). Prolonged growth of *Leishmania* species in cell culture. *J. Parasitol.*, **55**:196-199.
46. GABIUS, H-J., SPRINGER, W. R. & BARONDES S. H. (1985). Receptor for the cell binding site of Discoidin I. *Cell*, **42**:449-456.
47. GARDINER, P. R. & DWYER, D. M. (1983). Radioiodination and identification of externally disposed membrane components of *Leishmania tropica*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **8**:283-295.
48. GARDINER, P. R., JAFFE, C. L. & DWYER, D. M. (1984). Identification of cross-reactive promastigote cell surface antigens of some leishmanial stocks by ¹²⁵I labelling and immunoprecipitation. *Infect. Immun.*, **43**:637-643.

49. GOTTLIEB, M. & DWYER, D. M. (1981). Protozoan parasite of humans: surface membrane with externally disposed acid phosphatase. *Science*, **212**:939-941.
50. GREENBLATT, C. L. (1983). Action of leishmanial excreted factor (EF) on human lymphoblast transformation. *Parasite Immunol.*, **5**:249-256.
51. GREENBLATT, C. L., SLUTZKY, G. M., de IBARRA, A. L. & SNARY, D. (1983). Monoclonal antibodies for serotyping *Leishmania* strains. *J. Clin. Microbiol.*, **18**:191-193.
52. GRIFFIN, F. M. & GRIFFIN, J. A. (1980). Augmentation of macrophage complement receptor function *in vitro*. II. Characterization of the effects of a unique lymphokine upon the phagocytic capabilities of macrophages. *J. Immunol.*, **25**:844-849.
53. GUEUGNOT, J. (1980). Recherches sur la valeur des lectines dans l'étude taxonomique de Trypanosomatidae des genres *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leishmania*, *Trypanosoma*. *Thèse de Doctorat d'Etat ès-Sciences Pharmaceutiques*, Clermont-Ferrand I, pp 224 .
54. GUEUGNOT, J., GUILLOT, J., DAMEZ, M. & COULET, M. (1984). Identification and taxonomy of human and animal *Leishmania* by lectin-mediated agglutination. *Acta Tropica*, **41**:135-143.
55. HANDMAN, E. & GREENBLATT, C. L. (1977). Promotion of leishmanial infections in non-permissive host macrophages by conditioned medium. *Z. Parasitenkde.*, **53**:143-147.
56. HANDMAN, E. & SPIRA, D. T. (1977). Growth of *Leishmania* amastigotes in macrophages from normal and immune mice. *Z. Parasitenkde.*, **53**:75-81.

57. HANDMAN, E. & CURTIS, J. M. (1982). *Leishmania tropica* : surface antigens of intracellular and flagellate forms. *Exp. Parasitol.*, **54**:243-249.
58. HANDMAN, E. & HOCKING, R. E. (1982). Stage-specific, strain-specific and cross-reactive antigens of *Leishmania* species identified by monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, **37**:28-33.
59. HANDMAN, E., HOCKING, R. E., MITCHELL, G. F. & SPITHILL, T. W. (1983). Isolation and characterization of infective and non-infective clones of *Leishmania tropica*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **7**:111-126.
60. HANDMAN, E., GREENBLATT, C. L. & GODING, J. W. (1984). An amphipathic sulphated glycoconjugate of *Leishmania*: characterization with monoclonal antibodies. *EMBO J.*, **3**:2301-2306.
61. HANDMAN, E. & GODING, J. (1985). The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *EMBO J.*, **2**:329-336.
62. HANDMAN, E. & MITCHELL, G. F. (1985). Immunization with *Leishmania* receptor for macrophages protects mice against cutaneous leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**:5910-5914.
63. HAUTANEN, A. & KESKI-OJA, J. (1983). Interaction of fibronectin with complement component C3. *Scand. J. Immunol.*, **17**:225-230.
64. HERNANDEZ, A. G. (1982). Lectins as a tool in parasite research. *In* Biochemical Characterization of *Leishmania*. M. L. Chance and B. C. Walton (eds.). UNDP/World Bank/WHO, Geneva, p.181-196.

65. HYAFIL, F., MORELLO, D., BABINET, C. & JACOB, F. (1980). A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell*, **21**:927-934.
66. ISHIZAKA, T. (1982). Biochemical analysis of triggering signals induced by bridging of IgE receptors. *Federation Proceedings*, **41**:17-21.
67. JACKSON, P. R. & DIGGS, C. L. (1983). *Trypanosoma rhodisiense* blood stream trypomastigote and culture procyclic cell surface carbohydrates. *J. Protozool.*, **30**:662-668.
68. JACOBSON, R. L., SLUTZKY, G. M., GREENBLATT, C. L. & SCHNUR L. F. (1982). Surface reaction of *Leishmania* I. Lectin mediated agglutination. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **76**:45-52.
69. JAFFE, C. L. & McMAHON-PRATT, D. (1983). Monoclonal antibodies specific for *Leishmania tropica*. I. Characterization of antigens associated with stage- and species-specific determinants. *J. Immunol.*, **131**:1987-1993.
70. JAFFE, C. L., BENNETT, E., GRIMALDI, G. & McMAHON-PRATT, D. (1984). Production and characterization of species-specific monoclonal antibodies against *Leishmania donovani* for immunodiagnosis. *J. Immunol.*, **133**:440-447.
71. JAFFE, C. L. & SARFSTEIN, R. (1987). Species specific antibodies to *Leishmania tropica minor* recognize somatic antigens and exometabolites. *J. Immunol.*, **139**:1310-1319.
72. JAFFE, C. L. & McMAHON-PRATT, D. (1988). The identification of membrane glycoconjugates in *Leishmania* species. *J. Parasitol.*, **74**:548-561.

73. JAFFE, C. L. & ZALIS, M. (1988). Purification of two *Leishmania donovani* membrane proteins recognized by sera from patients with visceral leishmaniasis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **27**:53-62.
74. JOINER, K. A., GROSSMAN, N., SCHMETZ, M. & LEIVE, L. (1986a). C3 binds preferentially to long-chain polysaccharide during alternative pathway activation by *Salmonella montevideo*. *J. Immunol.*, **136**:710-715.
75. JOINER, K. A., SHER, A., GAITHER, T. & HAMMER, C. (1986b). Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor B. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **83**:6593-6597.
76. KILLICK-KENDRICK, R., MOLYNEUX, D. H. & ASHFORD, R. W. (1974). *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the midgut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc. R. Soc. London, Series B*, **187**:409-419.
77. KIRKPATRICK, C. E. & TERWAY-THOMPSON, C. A. (1986). Biochemical characterization of some raptor trypanosomes. I. *In vitro* cultivation and lectin-binding studies. *Can. J. Zool.*, **64**:189-194.
78. KONO, I., SAKURAI, T., KABASHIMA, T., YAMANE, K. & KASHIWAGI, H. (1983). Fibronectin binds to C1a: possible mechanisms for their coprecipitation in cryoglobulins from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.*, **52**:305-310.
79. LEGRAND, D., DESJEUX, P., LE PONT, F., BRENIERE, S. F., LEMESRE, J. L., SANTORO, F. & CAPRON, A. (1987). Identification of a major 72 kilodalton surface antigen in twelve isolates of *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **24**:117-124.

80. LEPAY, D. A., NOGUEIRA, N. & COHEN, Z. (1983). Surface antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Exp. Med.*, **157**:1562-1572.
81. LEWIS, D. H. (1974). Infection of tissue culture cells of low phagocytic ability by *Leishmania mexicana*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **68**:327-336.
82. LEWIS, D. H. & PETERS, W. (1979). The resistance of intracellular *Leishmania* parasites to digestion by lysosomal enzymes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **71**:295-312.
83. LIS, H. & SHARON, N. (1986). Lectins as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.*, **55**:35-67.
84. LISCHWE, M. A. & OCHS, D. (1982). A new method for partial peptide mapping using N-chlorosuccinimide/urea and peptide silver staining in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Ann. Biochem.*, **127**: 453-457.
85. LOCKSLAY, R. M. & KLEBANOFF, S. J. (1983). Oxygen dependent microbicidal systems of phagocytes and host defence against intracellular protozoa. *J. Cell. Biochem.*, **22**:173-185.
86. LONDNER, M. V., FRANKENBURG, S., SLUTZKY, G. M. & GREENBLATT, C. L. (1983). Action of leishmanial excreted factor (EF) on human lymphoblast transformation. *Parasite Immunol.*, **5**:249-256.
87. MARCUS, D. M. & SCHWARTING, G. A. (1976). Immunochemical properties of glycolipids and phospholipids. *Adv. Immunol.*, **23**:203-240.
88. MATTOCK, N. M. & PETERS, W. (1975). The experimental chemotherapy of leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **69**:349-357.

89. McMAHON-PRATT, D. & DAVID, J. R. (1982). Monoclonal antibodies recognizing determinants specific for the promastigote stage of *Leishmania mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **6**:317-327.
90. McMAHON-PRATT, D., BENNETT, E., GRIMALDI, G. & JAFFE, C. L. (1985). Subspecies- and species-specific antigens of *Leishmania mexicana* characterized by monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, **134**:1935-1939.
91. MICKLEM, K. J., SIM, R. B. & SIM, E. (1984). Analysis of C3 receptor activity on human B lymphocytes and isolation of the complement receptor type 2 (CR2). *Biochem. J.*, **224**:75-86.
92. MILLER, H. C. & TWOHY, D. W. (1969). Cellular immunity to *Leishmania donovani* in macrophages in culture. *J. Parasitol.*, **55**:200-207.
93. MISLE, J. A., MARQUEZ, M. E. & HERNANDEZ, A. G. (1985). Solubilization and partial purification of a cell surface component of *Leishmania braziliensis*. *Z. Parasitenkde.*, **71**:419-428.
94. MITCHELL, G. F. & HANDMAN, E. (1986). The glycoconjugate derived from a *Leishmania major* receptor for macrophages is a suppressogenic, disease-promoting antigen in murine cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, **8**:255-263.
95. MOLYNEUX, 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 *Lutzomia longipalpis*. *Proc. R. Soc. London, Series B*, **190**:341-357.
96. MOSESSON, M. W. & AMRANI, D. L. (1980). The structure and biologic activities of plasma fibronectin. *Blood*, **56**:145-158.

97. MOSHER, D. F. (1980). Fibronectin. *Progr. Hemostatis Thromb.*, **5**:111-151.
98. MOSSER, D. M. & EDELSON, P. J. (1984). Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *J. Immunol.*, **132**:1501-1505.
99. MOSSER, D. M. & EDELSON, P. J. (1985). The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J. Immunol.*, **135**:2785-2789.
100. MOSSER, D. M. & EDELSON, P. J. (1987). The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature*, **327**:329-331.
101. MURRAY, H. W. (1981). Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. *J. Exp. Med.*, **153**:1302-1315.
102. MURRAY, H. W. (1982). Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J. Immunol.*, **129**:351-357.
103. NAKAGURA, K., TCHIBANA, H., KANEDA, Y. & NAKAE, T. (1986). *Leishmania braziliensis*: localization of glycoproteins in promastigotes. *Exp. Parasitol.*, **61**:335-342.
104. NOLAN, T. J. & FARRELL, J. P. (1985). Inhibition of *in vivo* and *in vitro* infectivity of *Leishmania donovani* by tunicamycin. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **16**:127-135.
105. O'DALY, J. A. & ASO, P. M. (1979). *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, and *Leishmania mexicana*: extract factor that lyses mammalian cells. *Exp. Parasitol.*, **47**:222-231.

106. OUAISSI, M. A., AFCHAIN, D., CAPRON, A. & GRIMAUD, J. A. (1984). Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. *Nature*, **308**:380-382.
107. OUAISSI, M. A., CORNETTE, J. & CAPRON, A. (1984). Occurrence of fibronectin antigenic determinants on *Schistosoma mansoni* lung schistosomula and adult worms. *Parasitology*, **88**:85-96.
108. OUAISSI, M. A., CORNETTE, J., AFCHAIN, D., CAPRON, A., GRAS-MASSE, H. & TARTAR, A. (1986). *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. *Science*, **234**:603-607.
109. OUAISSI, M. A., CORNETTE, J. & CAPRON, A. (1986). Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* **19**:201-211.
110. OUAISSI, M. A. (1988). Role of the RGD sequence in parasite adhesion to host cells. *Parasitology Today*, **4**:169-173.
111. OUAISSI, M. A. & CAPRON, A. (1989). Some aspects of protozoan parasite-host cell interactions with special reference to RGD-mediated recognition process. *Microbial Pathogenesis*, **6**:1-5.
112. PAN, A. A. & HONIGBERG, B. M. (1985). *Leishmania mexicana pifanoi*: *in vivo* and *in vitro* interactions between amastigotes and macrophages. *Z. Parasitenkde.*, **71**:3-13.
113. PEARLSTEIN, E., GOLD, L. I. & GARCIA-PARDO, A. (1980). Fibronectin: a review of its structure and biological activity. *Mol. Cell. Biochem.*, **29**:103-128.
114. PEARSON, R. D. & STEIGBIGEL, R. T. (1980). Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. *J. Immunol.*, **125**:2195-2201.

115. PEREIRA, M. E. A., ANDRADE, A. F. B. & RIBEIRO, J. M. (1981). Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. *Science*, **211**:597-600.

116. PETAVY, A. F., GUEUGNOT, J., GUILLOT, J., DAMEZ, M. & COULET, M. (1978). Fixation des lectins sur *Leishmania tropica* et *Crithidia luciliae*. *Protistologica*, **14**:103-108.

117. PIERCE, M. & BALLOU, C. E. (1983). Cell-cell recognition in yeast. Characterization of several agglutination factors from *Saccharomyces kluyveri*. *J. Biol. Chem.*, **258**:3576-3582.

118. PIERSCHBACHER, M. D., HAYMAN, E. G. & RUOSLAHTI, E. (1981). Location of the cell-attachment site in fibronectin with monoclonal antibodies and proteolytic fragments of the molecule. *Cell*, **26**:259-267.

119. PIERSCHBACHER, M. D., HAYMAN, E. G. & RUOSLAHTI, E. (1983). Synthetic peptide with the cell attachment activity of fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**:1224-1227.

120. PIERSCHBACHER, M. D. & RUOSLAHTI, E. (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, **309**:30-33.

121. PLANCARTE, A., FLISSER, A. & LARRALDE, C. (1983). Fibronectin-like properties in antigen B from the cysticercus of *Taenia solium*. *Cytobios.*, **36**:83-93.

122. POOLE, S., FIRTEL, R. A., LAMAR, E. & ROWEKAMP, W. (1982). Sequence and expression of the discoidin I gene family in *Dictyostelium discoïdeum*. *J. Mol. Biol.*, **153**:273-289.

123. RAMASAMY, R., KAR, S. K. & JAMNADAS, H. (1983). Cross reacting surface antigens of *Leishmania* promastigotes. *Int. J. Parasitol.*, **13**:337-341.
124. RAPPORT, M. M. & GRAF, L. (1969). Immunochemical reactions of lipids. *Prog. Allergy*, **13**:273-331.
125. REMALEY, A. T., KUHN, D. B., BASFORD, R. E., GLEW, R. H. & KAPLAN, S. S. (1984). Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O₂ production. *J. Biol. Chem.*, **259**:11173-11175.
126. RIBAU, C. L., MAGLOIRE, H., JOFFRE, A. & MORRIER, J. J. (1983). Immuno-histochemical localization of fibronectin-like protein on the cell surface of oral flagellate *Trichomonas tenax*. *J. Biol. Buccale*, **11**:41-51.
127. ROSEN, G., LONDNER, M. V., SEVLEVER, D. & GREENBLATT, C. L. (1988). *Leishmania major*: glycolipid antigens recognized by immune human sera. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **27**:93-100.
128. RUOSLAHTI, E. (1981). Fibronectin. *J. Oral Pathol.*, **10**:3-13.
129. RUOSLAHTI, E. & PIERSCHBACHER, M. D. (1986). Arg-Gly-Asp: A versatile cell recognition signal. *Cell*, **44**:517-518.
130. RUSSELL, D. G. & WILHELM, H. (1986). The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J. Immunol.*, **136**:2613-2620.
131. RUSSELL, D. G. (1987). The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant C3-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes. *Eur. J. Biochem.*, **164**:213-221.

132. RUSSELL, D. G. & ALEXANDER, J. (1988). Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *J. Immunol.*, **140**:1274-1279.
133. RUSSELL, D. G. & WRIGHT, S. D. (1988). Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania* promastigotes. *J. Exp. Med.*, **168**:279-292.
134. SACKS, D. L. & PERKINS, P. V. (1984). Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, **223**:1417-1419.
135. SACKS, D. L. & PERKINS, P. V. (1985). Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **34**:456-459.
136. SACKS, D. L., HIENY, S. & SHER, A. (1985). Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J. Immunol.*, **135**:564-569.
137. SADICK, M. D. & RAFF, H. V. (1985). Differences in expression and exposure of promastigote and amastigote membrane molecules in *Leishmania tropica*. *Infect. Immun.*, **47**:395-400.
138. SCHNUR, L. F. (1982). The immunological identification and characterization of leishmanial stocks and strains with special reference to excreted factor serotyping. In *Biochemical Characterization of Leishmania*. M. L. Chance and B. C. Walton (eds.). UNDP/World Bank/WHO, Geneva, p.25-47.
139. SCHOTTELIUS, J. (1982). Lectin binding strain-specific carbohydrates on the cell surfaces of *Leishmania* strains from the Old World. *Z. Parasitenkunde*, **66**:237-247.

140. SCHOTTELIUS, J. & GONCALVES DA COSTA, S. C. (1982). Studies on the relationship between lectin binding carbohydrates and different strains of *Leishmania* from the New World. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **77**:19-27.
141. SCHWARZ, R. T. & DATEMA, R. (1982). The lipid pathway of protein glycosylation and its inhibitors: the biological significance of protein-bound carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem.*, **40**:287-374.
142. SEMPREVIVO, L. H. & MacLEOD, M. E. (1981). Characterization of the exometabolite of *Leishmania donovani* as a novel glycopeptidophospholipid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**:1179-1185.
143. SHARON, N. (1984). Carbohydrates as recognition determinants in phagocytosis and in lectin-mediated killing of target cells. *Biol. Cell*, **51**:239-246.
144. SHEPHARD, V. L., LEE, Y. C., SCHLESINGER, P. H. & STAHL, P. (1981). L-fucose-terminated glycoconjugates are recognized by pinocytosis receptors on macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **78**:1019-1022.
145. SILVERSTEIN, S. C. (1977). Endocytic uptake of particles by mononuclear phagocytes and the penetration of obligate intracellular parasites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **26**:161-168.
146. SIM, R. B., TWOSE, T. M., PATERSON, D. S. & SIM, E. (1981). The covalent-binding reaction of complement component C3. *Biochem. J.*, **193**:115-127.
147. SLUTZKY, G. M., EL-ON, J. & GREENBLATT, C. L. (1979). Leishmanial excreted factor. Protein-bound and free form from promastigote cultures of *Leishmania tropica* and *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.*, **26**:916-924.

148. SLUTZKY, G. M. (1982). Identification of galactose as the immunodominant sugar of leishmanial excreted factor and subsequent labelling with galactose oxidase and sodium boro (3-H)hydride. *Infect. Immun.*, **37**:10-14.
149. SLUTZKY, G. M., LONDNER, M. V. & GREENBLATT, C. L. (1985). Lipid and lipopolysaccharide-like antigens of *Leishmania* promastigotes. *J. Protozool.*, **32**:347-352.
150. SMOLARSKY, M. (1980). A simple radioimmunoassay to determine binding of antibodies to lipid antigens. *J. Immunol. Methods*, **38**:85-93.
151. SNARY, D. (1983). Cell surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* : protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **77**:126-129.
152. SNARY, D., FERGUSON, M. A. J., ALLEN, A. K. & SHER, A. (1984). Structure and function of a cell surface glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. In *Molecular Biology of host-parasite interactions*. Alan R. Liss, Inc., New York, p. 239-247
153. STAHL, P. D., RODMAN, J. S., MILLER, M. J. & SCHLESINGER, P. H. (1978). Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **75**:1399-1403.
154. TURCO, S. J., WILKERSON, M. A. & CLAWSON, D. R. (1984). Expression of an unusual acidic glycoconjugate in *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.*, **259**:3883-3889.
155. VILLALTA, F. & KIERSZENBAUM, F. (1985). Role of surface N-acetylglucosamine residues on host cell infection by *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Acta*, **845**:216-222.

156. WILLIAMS, K. M., SACCI, J. B. & ANTHONY, R. L. (1986). Identification and recovery of *Leishmania* antigen displayed on the surface of mouse peritoneal macrophages infected *in vitro*. *J. Immunol.*, **136**:1853-1858.
157. WILSON, M. D. & PEARSON, R. D. (1984). Stage specific variations in lectin binding to *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.*, **46**:128-132.
158. WILSON, M. D. & PEARSON, R. D. (1986). Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. *J. Immunol.*, **136**:4681-4688.
159. WOZENCRAFT, A. O., SAYERS, G. & BLACKWELL, J. M. (1986). Macrophage type 3 complement receptors mediate serum-independent binding of *Leishmania donovani*: detection of macrophage-derived complement on the parasite surface by immunoelectron microscopy. *J. Exp. Med.*, **164**:1332-1337.
160. WOZENCRAFT, A. O. & BLACKWELL, J. M. (1987). Increased infectivity of stationary-phase promastigotes of *Leishmania donovani*: correlation with enhanced C3 binding capacity and CR3-mediated attachment to host macrophages. *Immunol.*, **60**:559-563.
161. WRIGHT, S. D. & SILVERSTEIN, S. C. (1983). Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J. Exp. Med.*, **158**:2016-2023.
162. WYLER, D. J. (1982). *In vitro* parasite monocyte interactions in human leishmaniasis. Evidence for an active role for the parasite in attachment. *J. Clin. Invest.*, **70**:82-88
163. YAMAMOTO, K. & JOHNSTON, R. B. (1984). Dissociation of phagocytosis from stimulation of the oxidative metabolic burst in macrophages. *J. Exp. Med.*, **159**:405-416.

164. YOUNG, J. D., UNKELESS, J. C., KABACK, H. R. & COHN, Z. A. (1983). Macrophage membrane potential changes associated with g 2b/g 1 Fc receptor-ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **80**:1357-1361.
165. ZEHAVI, U., EL-ON, J., PEARLMAN, E., ABRAHAMS, J. C. & GREENBLATT, C. L. (1983). Binding of *Leishmania* Promastigotes to macrophages. *Z. Parasitenkde.*, **69**:405-414.

RESUME EN ANGLAIS

SUMMARY

Externally disposed components from *Leishmania* sp. are likely to interact with the parasite's environment at various steps during the promastigote-macrophage interactions. The purpose of this study was to identify and characterize the promastigote stage specific molecules from *Leishmania chagasi* that are involved in the attachment of the parasite to mononuclear cells.

By using the parasites from standardized *in vitro* cultures, we have shown that the generation of an infective promastigote form of *Leishmania* sp. is growth-cycle dependent and is restricted to the stationary phase promastigotes. The technique of flow cytometry also allowed us to discriminate between the promastigotes at different stages of their *in vitro* differentiation. Parallel experiments have shown a striking correlation between forward scatter intensity, the growth curve and the infectivity of promastigote populations.

The infectivity of *Leishmania* promastigotes was found to be associated with the expression of a 63 kDa membrane glycoprotein (gp63) which appears specifically when parasites enter the stationary phase to become infective.

We have also shown that gp63 is a fibronectin-like molecule that shares certain biological and molecular characteristics with Fn. The gp63 also contains the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence found in the cell binding domain of Fn. The *in vitro* inhibition experiments strongly suggest that the promastigote may attach to the Fn-receptor of mononuclear cells through the RGD sequence of its gp63.

We have also described a heat stable excreted-secreted factor of 70 kDa from cultured *Leishmania* promastigotes that plays an important role in the regulation of their growth *in vitro* by means of a possible negative feed-back mechanism.

In conclusion, our study adds a new mechanism to the growing list of receptor-ligand interactions potentially involved in the *Leishmania*-host cell relationship. This study may contribute to a better understanding of the host-parasite association and also add some additional data to the concept of molecular mimicry.

TABLE DES MATIERES

A. REMERCIEMENTS	4
B. LISTE DES PUBLICATIONS	9
C. LISTE DES ABREVIATIONS	12
D. RESUME	14
E. INTRODUCTION	16
F. GENERALITES	19
I. LEISHMANIES ET LEISHMANIOSES	20
1. DEFINITION	20
2. REPARTITION GEOGRAPHIQUE ET IMPORTANCE	21
3. MORPHOLOGIE	23
4. BIOLOGIE DES LEISHMANIOSES	23
5. MANIFESTATIONS CLINIQUES	25
5.1. LEISHMANIOSE VISCERALE	25
5.1.1. Kala-Azar indien	25
5.1.2. Kala-Azar infantile	29
5.2. LEISHMANIOSES CUTANEEES	29
5.2.1. Forme sèche	29
5.2.2. Forme humide	30
5.3. LEISHMANIOSES CUTANEO-MUQUEUSES	30
II. RELATIONS HOTE-PARASITE	32
1. Attachement dans l'insecte vecteur	32
2. Attachement et pénétration du parasite dans les phagocytes mononucléés	32
3. Role du récepteur mannose/fucose	33
4. Attachement via le récepteur du complément	34
5. Coopération entre le MFR et le CR3 dans l'attachement du promastigote	36

6. Interaction des promastigotes avec les cellules hôtes	37
7. La fibronectine et son rôle dans l'interaction hôte-parasite	38
7.1. Interaction moléculaire de la fibronectine	39
7.1.1. Les composant du système du complément	39
7.1.2. Les surface bactériennes, virales et parasitaires	39
III. LA CONNAISSANCE DES ANTIGENES DES LEISHMANIES	41
1. Utilisation des lectines pour l'étude des Trypanosomatidae	42
2. Utilisation de la méthode de radio-marquage et d'anticorps monoclonaux pour la caractérisation d'antigènes	43
2.1. Les Lipides et Lipopolysaccharides	43
2.2. Les Glycoconjugués	44
2.3. Les Glycoprotéines	46
3. Le rôle d'antigènes de surface dans l'interaction hôte-parasite	49
G. TRAVAUX PERSONNELS	50
1. Article 1: Spécificité au niveau des protéines de surface des promastigotes de <i>Leishmania donovani</i> (Laveran et Mesnil, 1903), <i>Leishmania infantum</i> (Nicolle, 1908) et <i>Leishmania chagasi</i> (Cunha et Chagas, 1937).	51
2. Article 2: Etude sur la spécificité des antigènes de surface des promastigotes du complexe <i>Leishmania donovani</i> .	58
3. Article 3: Corrélation entre l'infectivité des promastigotes de <i>Leishmania</i> et leur expression antigénique de surface.	66
4. Article 4: La modification de l'infectivité des promastigotes de <i>Leishmania</i> est associée à l'expression d'un antigène de surface de 65 kDa.	75
5. Article 5: Etude de la différenciation morphologique <i>in vitro</i> des promastigotes de <i>L. chagasi</i> en fonction de leur maturation en culture.	83
6. Article 6: La glycoprotéine majeure de surface de <i>Leishmania chagasi</i> présente une réactivité immunologique croisée avec la fibronectine humaine.	93

7. Article 7: Autorégulation de la croissance <i>in vitro</i> des Trypanosomatidæ.	99
H. DISCUSSION	107
I. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	118
J. RESUME EN ANGLAIS	140
K. TABLE DES MATIERES	142

