

**IMMUNOLOGIE.** — *Résultats préliminaires en faveur de l'existence d'un antigène majeur de surface, spécifique de Leishmania braziliensis braziliensis.* Note de Dominique Legrand, Philippe Desjeux, Eric Prina, François Le Pont et Simone Frédérique Brénière, présentée par Jean-François Bach.

L'étude comparative des antigènes de surface de 10 souches boliviennes clonées et d'une souche brésilienne de référence de la sous-espèce *L. b. braziliensis* a permis de mettre en évidence une grande homogénéité au sein de ce groupe. Les souches éprouvées possèdent des profils antigéniques comparables où domine un antigène de 72 kD.

A l'opposé, la comparaison des antigènes de surface de *L. b. braziliensis* avec *L. b. guyanensis*, *L. b. panamensis*, *L. mexicana amazonensis* et *L. donovani chagasi* montre une hétérogénéité importante entre les sous-espèces et espèces de *Leishmania* étudiées. L'antigène de 72 kD n'est mis en évidence qu'à la surface de *L. b. braziliensis*.

**IMMUNOLOGY.** — Preliminary results in favour of the existence of a major surface antigen specific of *Leishmania braziliensis braziliensis*.

*The comparative surface antigen study of 10 bolivian strains and 1 brazilian reference strain from L. b. braziliensis sub-species shows an important homogeneity within this group. All the strains tested so far present similar antigenic patterns with a major antigen at 72 kD.*

*On the contrary, the comparative analysis of surface antigens of L. b. braziliensis with those of L. b. guyanensis, L. b. panamensis, L. mexicana amazonensis and L. donovani chagasi shows a large antigenic heterogeneity between the Leishmania sub-species and species we studied. The 72 kD antigen was only detected on L. b. braziliensis surface.*

**INTRODUCTION.** — Le complexe *L. braziliensis* est responsable, avec le complexe *L. mexicana*, des leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses humaines du Nouveau-Monde. Au sein du complexe *L. braziliensis*, trois sous-espèces ont été individualisées : *L. b. panamensis*, *L. b. guyanensis* et *L. b. braziliensis*, sur la base de critères biochimiques (isoenzymes, *k*-DNA, anticorps monoclonaux ([1]-[3])).

La caractérisation des antigènes de surface de *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana* et *L. donovani* a donné lieu à de nombreux travaux ([4]-[10]). Plusieurs auteurs décrivent un antigène majeur de 63 ou 65 kD commun à ces différentes espèces de *Leishmania* ([8]-[10]). En revanche, peu de travaux concernent *L. braziliensis* ([8], [10], [11]) et plus particulièrement *L. b. braziliensis* : seuls les travaux de Colomer-Gould et coll. [10] montrent l'existence d'un antigène majeur de 65 kD commun à *L. b. braziliensis*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. b. guyanensis* et *L. donovani*.

Étant donné l'importance des leishmanioses cutanée et cutanéomuqueuse en Bolivie, nous nous sommes attachés à la comparaison des antigènes de surface de 10 souches autochtones avec les souches de *Leishmania* de différentes espèces et sous-espèces.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — 1) *Parasites.* — Nous avons utilisé les formes promastigotes de culture (milieu LIT complémenté à 15% (v/v) en sérum de veau foetal) de :

- 10 souches de *L. b. braziliensis* (isolées au laboratoire et typifiées en isoenzymes [12]) provenant de différentes régions de Bolivie (Yungas, Alto-Béni et Béni).
- 1 souche brésilienne de *L. b. braziliensis* référencée MHOM/BR/75/M-2904 [12].
- 1 souche de *L. b. guyanensis* typifiée en isoenzymes et éprouvée par l'anticorps monoclonal B19 de D. McMahon-Pratt [3] spécifique de *L. b. guyanensis*.
- 1 souche de *L. b. panamensis* (CHO/PA/75/M-4039) typifiée en isoenzymes et testée par l'anticorps monoclonal B11 [3] spécifique de *L. b. panamensis*.
- 1 souche de *L. mexicana amazonensis* référencée IFLA/BR/67/PH-8 [12].
- 1 souche de *L. donovani chagasi* référencée MHOM/BR/00/M-2682 [12].

Toutes ces souches ont été clonées par micromanipulation. Chaque clone isolé s'est révélé identique à la souche mère dont il était issu (isoenzymes et antigènes de surface).

0249-6313/86/03030607 \$2.00 © Académie des Sciences

2. *Marquage des protéines de surface.* — Les parasites, récoltés en début de phase stationnaire de culture, ont été marqués à l'[\$^{125}\$I] par la méthode de l'Iodo-Gen [13] en présence d'aprotinine (100 U. ml<sup>-1</sup>), et les protéines de surface marquées ont été comparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide réticulé à 7% (SDS-PAGE), après réduction par le dithiothréitol à 50 mM [10].

3. *Immunoprécipitation des protéines de surface.* — L'immunoprécipitation d'extraits de promastigotes marqués en surface à l'[\$^{125}\$I] [14] est suivie d'une adsorption des immuns-complexes sur Protéine A-Sepharose CL-4B (Pharmacia, Uppsala, Suède) en présence d'aprotinine (100 U. ml<sup>-1</sup>) puis d'une analyse électrophorétique en SDS-PAGE à 7% des immuns-complexes dissociés. Nous avons utilisé pour les immunoprécipitations :

- 4 sérums de patients boliviens atteints de leishmaniose cutanée;
- 4 de patients boliviens atteints de leishmaniose cutanéomuqueuse;
- 4 de patients africains atteints de leishmaniose viscérale;
- 2 de patients boliviens atteints de la maladie de Chagas,
- et 2 sérums de patients sains.

Tous ces patients étaient cliniquement confirmés.

RÉSULTATS. — 1. *Étude des protéines de surface.* — L'analyse en SDS-PAGE à 7% des différentes souches de *L. b. braziliensis* révèle des profils peptidiques très semblables (fig. 1). En effet, les 10 souches boliviennes et la souche de référence du Brésil présentent au minimum 10 bandes électrophorétiques (de 25 à 300 kD) plus ou moins intenses selon la souche; seule une légère variabilité est enregistrée pour les poids moléculaires supérieurs à 100 kD. Deux protéines majeures de 58 et 72 kD sont présentes dans l'ensemble des souches de *L. b. braziliensis*.

A l'inverse, la comparaison des profils des souches de *L. b. braziliensis* avec ceux des souches de *L. b. guyanensis*, *L. b. panamensis*, *L. m. amazonensis* et *L. d. chagasi* met en évidence l'absence de bandes majeures communes. Les souches de *L. b. guyanensis*, *L. b. panamensis*, *L. m. amazonensis* et *L. d. chagasi* possèdent des protéines majeures de surface de respectivement : 66 kD; 64 et 56 kD; 65 kD; 66 à 60 kD et 50 kD.

#### EXPLICATIONS DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Autoradiographie de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide à 7% (SDS-PAGE) des promastigotes de *Leishmania* marqués en surface à l'[\$^{125}\$I]: souches boliviennes de *L. b. braziliensis* (1 à 10), souche brésilienne de référence de *L. b. braziliensis* (11), souche de *L. b. guyanensis* (12), souche de *L. mexicana amazonensis* (13), souche de *L. b. panamensis* (14) et souche de *L. donovani chagasi* (15). Les flèches (→) indiquent les protéines majeures de surface de 72 kD (a) et 58 kD (b) de *L. b. braziliensis*.

Fig. 1 — Autoradiogram of 7% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of surface radioiodinated *Leishmania* promastigotes: bolivian strains of *L. b. braziliensis* (1 to 10), brazilian reference strain of *L. b. braziliensis* (11), strain of *L. b. guyanensis* (12), strain of *L. mexicana amazonensis* (13), *L. b. panamensis* (14) and strain of *L. donovani chagasi* (15). Arrows (→) show the 72 kD (a) and 58 kD (b) surface major proteins of *L. b. braziliensis*.

Fig. 2. — Autoradiographie en SDS-PAGE à 7% des antigènes de surface de : *L. b. braziliensis* (M-2904) (1) immuno-précipités par un sérum de patient bolivien atteint de leishmaniose cutanéomuqueuse et *L. b. braziliensis* (M-2904) (2) et *L. d. chagasi* (M-2682) (3) immuno-précipités par un sérum de patient africain atteint de leishmaniose viscérale.

Fig. 2. — Autoradiogram of 7% SDS-PAGE of surface antigens of: *L. b. braziliensis* (M-2904) (1) precipitated with a serum of a bolivian patient with mucocutaneous leishmaniasis and *L. b. braziliensis* (M-2904) (2) and *L. d. chagasi* (M-2682) (3) precipitated with a serum of an african patient with visceral leishmaniasis.

Fig. 3. — Autoradiographie en SDS-PAGE à 12% des protéines de surface marquées à l'[\$^{125}\$I] de : *L. b. braziliensis* (M-2904) (1) et *L. m. amazonensis* (PH-8) (2).

Fig. 3. — Autoradiogram of 12% SDS-PAGE of iodinated surface proteins of: *L. b. braziliensis* (M-2904) (1) and *L. m. amazonensis* (PH-8) (2).

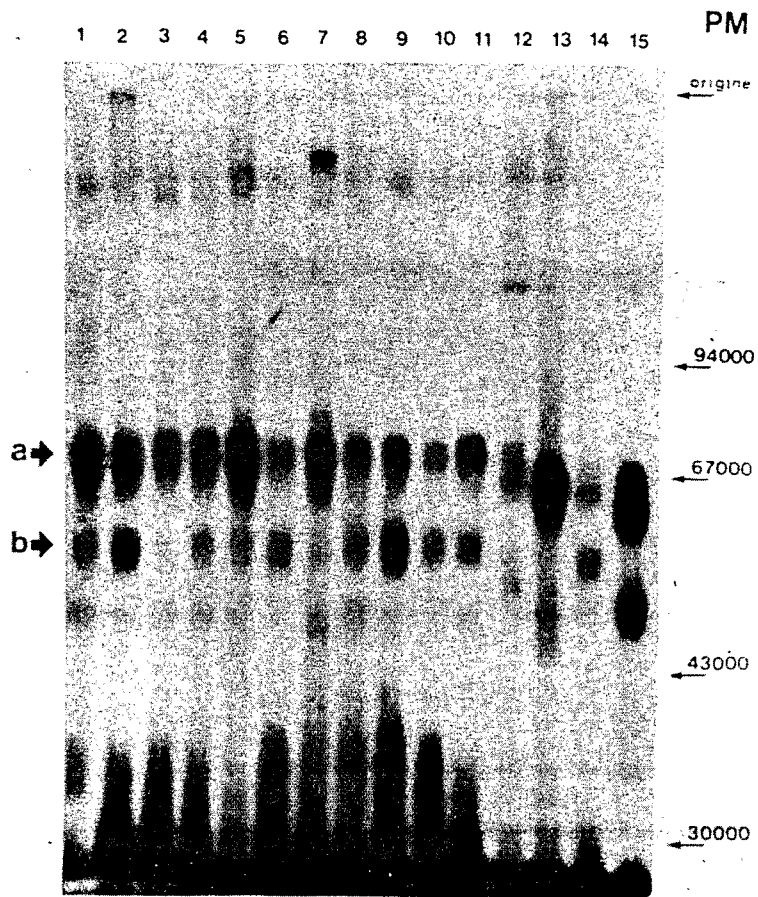


Fig. 1

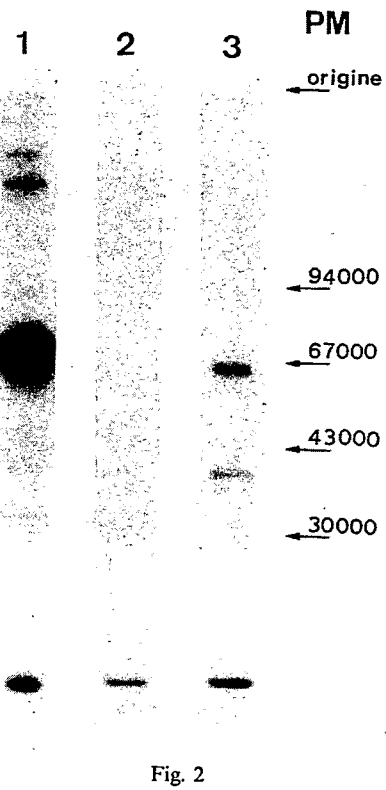


Fig. 2

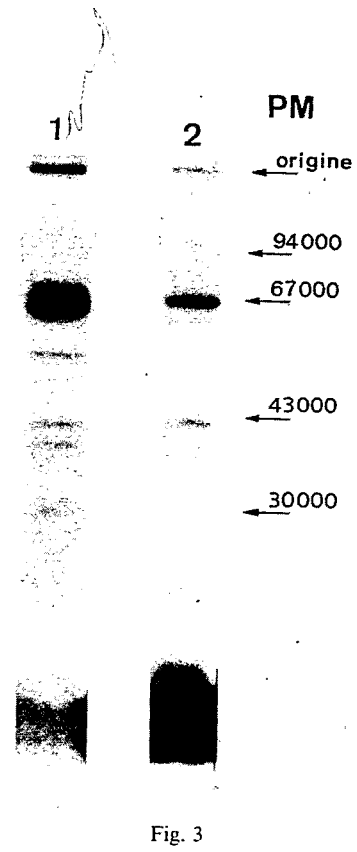


Fig. 3



2. *Étude des antigènes de surface.* — Les 8 sérums de patients leishmaniens immuno-précipitent toutes les protéines de surface des promastigotes de *L. b. braziliensis* déjà visualisées, sauf la protéine majeure de 58 kD et les protéines de faible poids moléculaire; la protéine de surface de 72 kD est très fortement reconnue (fig. 2). Les protéines majeures des autres espèces et sous-espèces de *Leishmania* étudiées ne sont pas reconnues par ces sérums.

Par ailleurs, les 4 sérums de patients atteints de leishmaniose viscérale reconnaissent très fortement toutes les protéines de surface de la souche de référence *L. donovani chagasi*, mais aucun des antigènes de surface des souches de *L. b. braziliensis* (fig. 2).

Enfin, les sérums contrôles de patients sains et de patients chagasiques ne reconnaissent aucun des antigènes de surface des souches de *L. b. braziliensis*.

CONCLUSION. — La comparaison des 10 souches boliviennes de *L. b. braziliensis* entre elles et avec la souche de référence du Brésil met en évidence une identité remarquable des profils protéiques et antigéniques de surface. La sous-espèce *L. b. braziliensis* semble donc présenter une homogénéité antigénique importante, ce qui corrobore les résultats obtenus par les analyses isoenzymatiques [12]. Par contre les sous-espèces de *L. b. braziliensis*, *L. b. guyanensis* et *L. b. panamensis* présentent des profils peptidiques très différents. Il serait intéressant d'élargir cette étude à des souches d'origines plus diverses.

Nous avons constaté une différence de masse moléculaire entre l'antigène majeur de *L. b. braziliensis* (72 kD) et les antigènes majeurs des autres souches étudiées, voisins de 65 kD, ainsi qu'ils ont été décrits ([8]-[10]). L'utilisation de gels peu réticulés (7%) est beaucoup plus discriminative que celle de gels à 10 ou 12% (généralement utilisés) pour différencier deux protéines de masses moléculaires voisines de 70 kD. En effet, lors de l'analyse en SDS-PAGE à 12% (fig. 3), les vitesses de migration des protéines de 72 et 58 kD (*L. b. braziliensis*) et de 65 kD (*L. m. amazonensis*) sont confondues.

Nos résultats préliminaires ne confirment pas les travaux de Colomer-Gould et coll. [10] qui ont décrit un antigène majeur commun à diverses espèces et sous-espèces du genre *Leishmania* (*L. b. braziliensis*, *L. b. guyanensis*, *L. mexicana* et *L. donovani*).

L'antigène majeur de 72 kD que nous décrivons ici semble spécifique de la sous-espèce *L. b. braziliensis* car, d'une part, les sérums de patients africains atteints de leishmaniose viscérale ne reconnaissent pas cet antigène et, d'autre part, les sérums de patients atteints de leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse ne reconnaissent aucun des antigènes majeurs de *L. b. guyanensis*, *L. b. panamensis*, *L. m. amazonensis* et *L. d. chagasi*.

L'étude de la spécificité de l'antigène de 72 kD devra être poursuivie en utilisant un plus grand nombre de sérums et des anticorps monoclonaux, cet antigène pourra être un bon candidat pour un test diagnostique des leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses du Nouveau Monde.

Cette étude a pu être réalisée grâce à des subventions du Ministère des Relations extérieures (Service de la Coopération et du Développement), du Ministère de la Recherche et de l'Industrie (PVD/84/L-0689), de l'O.M.S. (Grant ID-850313) et de la Commission des Communautés Européennes (TSD-M-042-BOL).

Reçue le 30 juin 1986, acceptée le 15 septembre 1986.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] M. A. MILES, R. LAINSON, J. J. SHAW, M. POVOA et A. A. DE SOUZA, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 75, 1981, p. 524-529.

[2] R. S. PACHECO, U. G. LOPES, C. M. MOREL, G. Jr. GRIMALDI et H. MOMEN, *Ann. Parasit. Hum. Comp.* (sous presse).

- [3] D. MCMAHON-PRATT, E. BENNETT et J. R. DAVID, *J. Immunol.*, 129, 1982, p. 926-927.  
[4] E. HANDMAN et J. M. CURTISS, *Exp. Parasitol.*, 54, 1982, p. 243-247.  
[5] P. R. GARDINER et D. M. DWYER, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 8, 1983, p. 283-295.  
[6] D. A. LEPAY, N. NOGUEIRA et Z. COHN, *J. Exp. Med.*, 157, 1983, p. 1562-1572.  
[7] J. L. LEMESRE, F. S. RIZVI, D. AFCHAIN, M. SADIGURSKY, A. CAPRON et F. SANTORO, *Infect. Immun.*, 50, 1985, p. 136-141.  
[8] P. R. GARDINER, C. L. JAFFE et D. M. DWYER, *Infect. Immun.*, 43, 1984, p. 637-643.  
[9] R. J. ETGES, J. BOUVIER, R. HOFFMAN et C. BORDIER, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 14, 1985, p. 141-149.  
[10] V. COLOMER-GOULD, L. G. QUINTAO, J. KEITHLY et N. NOGUEIRA, *J. Exp. Med.*, 162, 1985, p. 902-916.  
[11] J. A. MISLE, M. E. MARQUEZ et A. G. HERNANDEZ, *Z. Parasitenkd.*, 71, 1985, p. 419-428.  
[12] P. DESJEUX, F. LE PONT, S. MOLLINEDO et M. TIBAYRENC, *Ann. Parasit. Hum. Comp.* (sous presse).  
[13] The Leishmaniasis, Report of a WHO Expert Committee, World Health Organization, Geneva, 1984.  
[14] P. J. FRAKER et J. C. SPECK, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80, 1978, p. 849-857.  
[15] C. DISSOUS, C. DISSOUS et A. CAPRON, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 3, 1981, p. 215-225.

D. L. : Laboratoire de Chimie biologique et Unité associée au C.N.R.S. n° 217,  
Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois,  
59655 Villeneuve-d'Ascq Cedex,  
I.B.B.A., C/o Ambassade de France, Casilla 824, La Paz, Bolivia;

P. D. : Institut Pasteur de Paris,  
I.B.B.A., C/o Ambassade de France, Casilla 824, La Paz, Bolivia;

F. L. P., S. F. B. : O.R.S.T.O.M., I.B.B.A., Casilla 8714, La Paz, Bolivia;

E. P. : I.B.B.A., C/o Ambassade de France, Casilla 824, La Paz, Bolivia.