

DAU  
Ble2

Université des Sciences et Techniques  
du Languedoc - Montpellier II

**Diplôme d'Etude Approfondie de Parasitologie**  
**Mémoire de stage**

Année 1996-1997

Etude des activités protéasiques constitutives et excrétées-sécrétées au  
cours du cycle de développement parasitaire de *Leishmania amazonensis*

Soutenu le 11 juillet 1997

par Sarah MAQUAIRE

Unité de Biologie Parasitaire, laboratoire d'Epidémiologie  
des Maladies à Vecteur

Centre de recherche ORSTOM Montpellier

Directeur de stage : Jean-Loup LEMESRE

Encadrement : Mireille CAVALEYRA

Fonds Documentaire ORSTOM



010011143

Fonds Documentaire ORSTOM

Cote : A \* 11143 Ex : 1

Université des Sciences et Techniques  
du Languedoc - Montpellier II

**Diplôme d'Etude Approfondie de Parasitologie**

**Mémoire de stage**

Année 1996-1997

Etude des activités protéasiques constitutives et excrétées-sécrétées au  
cours du cycle de développement parasitaire de *Leishmania amazonensis*

Soutenu le 11 juillet 1997

par Sarah MAQUAIRE

Unité de Biologie Parasitaire, laboratoire d'Epidémiologie  
des Maladies à Vecteur  
Centre de recherche ORSTOM Montpellier  
Directeur de stage : Jean-Loup LEMESRE  
Encadrement : Mireille CAVALEYRA

## TABLE DES MATIERES

### RESUME

INTRODUCTION	1
I. GENERALITES	2
1. Position systématique et répartition géographique	2
2. Cycle évolutif des leishmanies	2
3. Aspect clinique de la maladie	3
II. ELEMENTS NECESSAIRES A LA COMPREHENSION DE L'ETUDE ET OBJECTIFS	4
1. Les protéases des leishmanies	4
1.1. Introduction	4
1.2. La métalloprotéase majeure de surface des promastigotes ou gp63	4
1.3. Les protéases à cystéine	5
2. Les facteurs d'excrétion-sécrétion	
2.1. Les facteurs d'excrétion-sécrétion chez les leishmanies	7
2.2. Sécrétion de protéases	8
3. Objectifs de l'étude	9
III. MATERIEL ET METHODES	9
1. Obtention du matériel parasitaire	9
1.1. Cultures <i>in vitro</i> de <i>L. amazonensis</i>	9
1.2. Récolte du matériel parasitaire	10
1.3. Préparation des lysats parasitaires	11
1.3.1. Préparation des extraits polypeptidiques totaux	11
1.3.2. Solubilisation des protéines membranaires par séparation de phases au Triton X114	11
1.4. Concentration des molécules d'excrétion-sécrétion à partir du surnageant de culture	11
1.5. Dosage protéique	11
2. Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide	12
2.1. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	12
2.2. Révélation des protéines au nitrate d'argent	12
3. Détection et caractérisation des activités protéasiques	12
3.1. Gel d'empreinte	12
3.2. Utilisation d'inhibiteurs spécifiques de protéases	13
IV. RESULTATS	13
1. Réalisation <i>in vitro</i> des principales séquences du cycle dedéveloppement parasitaire de <i>L. amazonensis</i>	13
1.1. Cinétiques de culture <i>in vitro</i> des formes promastigotes et amastigotes en milieu complètement défini	13
1.2. Cinétique de différenciation <i>in vitro</i> des formes promastigotes en formes amastigotes	13
2. Etude des profils polypeptidiques totaux des formes promastigotes et amastigotes de <i>L. amazonensis</i> et de leurs produits d'excrétion-sécrétion	14
2.1. Choix des conditions d'analyse	14

2.2. Comparaison des profils polypeptidiques parasitaires des formes promastigotes et amastigotes de phase stationnaire en condition réductrice	14
2.2.1. Analyse des EPT	14
2.2.2. Analyse des extraits obtenus après séparation de phase	15
2.3 Analyse des protéines naturellement excrétées-sécrétées au cours des cinétiques de culture des deux stades parasitaires	15
<b>3. Expression et caractérisation des activités protéasiques parasitaires totales et excrétées-sécrétées</b>	<b>16</b>
3.1. Expression et identification des activités protéasiques cellulaires et excrétées-sécrétées par les parasites de phase stationnaire	17
3.2. Étude de la compartimentation des activités protéasiques et de leurs conditions d'expression	18
3.2.1. Expression d'activités protéasiques en fonction des facteurs physico-chimiques liés à l'environnement des parasites	18
3.2.2. Compartimentation cellulaire des protéases	19
3.3. Etude de l'expression des protéases lors des principales séquences du cycle développement parasitaire <i>in vitro</i> de <i>L. amazonensis</i>	19
3.3.1. Activités protéasiques exprimées par les formes promastigotes et les amastigotes au cours de leur culture <i>in vitro</i>	19
3.3.1.1. Analyse des lysats parasitaires totaux	20
3.3.1.2. Analyse des produits d'excrétion-sécrétion	20
3.3.2. Etude des activités protéasiques au cours de la différenciation de promastigotes en amastigotes	21
3.3.2.1. Analyse des EPT	21
3.3.2.2. Analyse des produits d'excrétion-sécrétion	21
<b>V. DISCUSSION</b>	<b>22</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>26</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>27</b>
<b>PROJET DE THESE</b>	

## RESUME (SUMMARY)

La leishmaniose est une cause de morbidité et de mortalité sur l'ensemble des régions tropicales et subtropicales de la terre. Le cycle de développement de ce parasite protozoaire est digénétique. Le promastigote flagellé se développe chez l'insecte vecteur, le phlébotome, et sa forme intracellulaire amastigote prolifère activement dans les phagocytes mononuclées de l'hôte vertébré.

La mise au point récente de cultures axéniques et asériques en milieu complètement défini de différentes espèces de *Leishmania* a permis d'accéder à la caractérisation des protéines et protéases au niveau cellulaire mais aussi à celle des molécules naturellement excrétées-sécrétées par les promastigotes et les amastigotes au cours des différentes étapes du cycle de développement parasitaire de *Leishmania amazonensis*. Leur analyse a été principalement réalisée sur gel d'empreinte après séparation électrophorétique en gel d'acrylamide SDS-PAGE contenant 0,7 % de gélatine copolymérisée.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'expression de trois classes de protéases exprimées par ces parasites. Pour la première fois, la présence de protéases excrétées-sécrétées par les deux formes parasitaires a pu être démontrée et étudiée. De plus, certaines activités protéasiques, constitutives et/ou excrétées-sécrétées semblent associées aux processus de prolifération, de maturation et de différenciation de ce parasite.

La mise en évidence de ces produits d'excrétion-sécrétion *in vivo* pourrait permettre de développer de nouveaux outils thérapeutiques et immunologiques permettant de lutter contre cette endémie parasitaire.

\*\*\*\*\*

Leishmaniasis is a significant cause of morbidity and mortality in tropical and subtropical areas of the world. These protozoan parasites have a digenetic life cycle which includes a flagellate promastigote form in the sandfly vector and a nonflagellate intracellular amastigote stage dividing actively within the mononuclear phagocytes of vertebrate hosts. Leishmaniasis undergoes dramatic metabolic changes during the developmental life cycle.

The recent development of axenically-grown amastigotes and promastigotes of different *Leishmania* species in completely defined culture conditions (Lemesre et al. 1994. Lemesre patent PCT/FR N°94/00577) opened new opportunities to characterize proteins and proteolytic activities expressed by the two parasite stages but also naturally excreted-secreted in conditioned supernatants during the developmental life cycle of *L. amazonensis*.

Proteinases activities were examined after electrophoretic separation of lysate parasite and concentrated supernatants under non reducing conditions in 10 % resolving SDS-polyacrylamide gels containing copolymerized gelatin. Using these experimental conditions, we demonstrated that three classes of proteases were expressed by the two parasite stages. And, for the first time, we demonstrated and studied protease excreted-secreted by the two parasite stages. Some of these proteases activities seem to be linked with the different processes of proliferation, maturation and differentiation of *Leishmania amazonensis*.

The observation of such excreted-secreted factors *in vivo* could allow to develop new therapeutic and immunological tools.

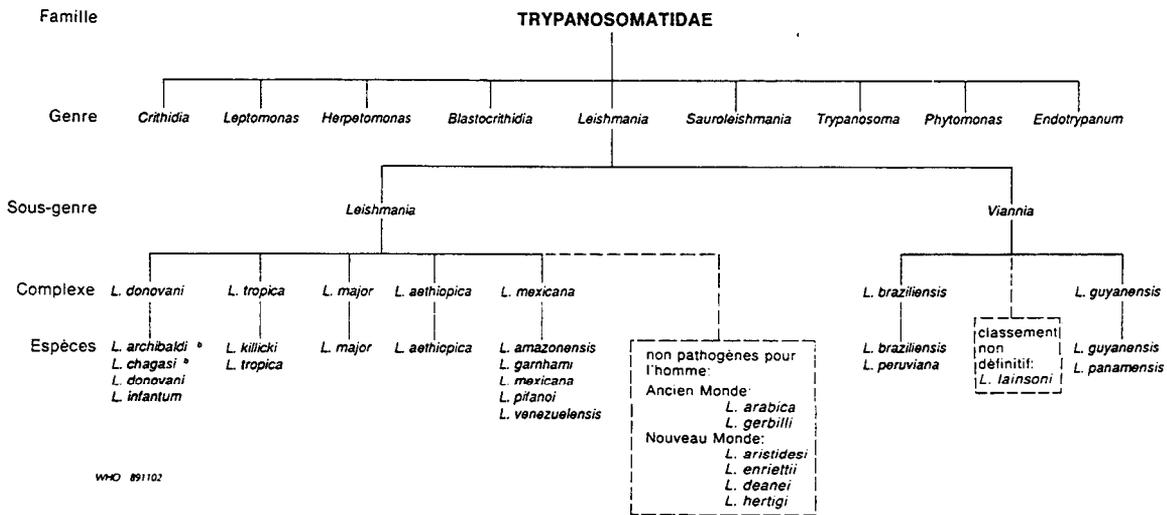


Figure 1: Taxonomie des leishmanies (O.M.S.,1990).

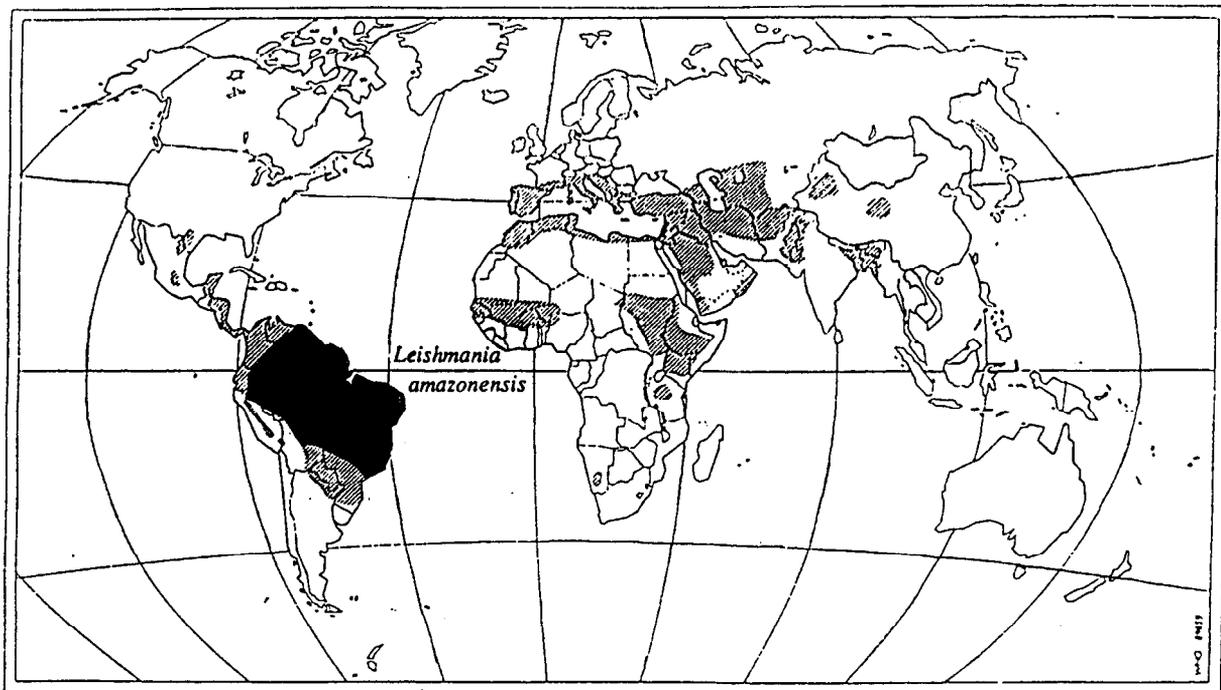


Figure 2: Distribution de la leishmaniose dans le monde (modifié d'après O.M.S.,1990)

# INTRODUCTION

Les leishmanioses constituent un groupe complexe d'affections parasitaires. Ces maladies semblent connues depuis des temps très reculés par les civilisations pré-incas, comme l'indique la figuration des mutilations faciales sur des céramiques de cette époque, et dans l'ancien monde sous le terme de *kala-azar*. Elles représentent une des six maladies parasitaires majeures et, à ce titre, sont considérées comme prioritaires par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.). De nos jours très répandues sur 4 continents, elles sont endémiques dans 88 pays dont 76 sont en voie de développement et 13 parmi les pays les moins développés.

En 1990, l'O.M.S. recensait plus de 12 millions de cas cliniques de leishmaniose sur une population à risque évaluée à 350 millions d'individus. En 1981, environ 400 000 nouveaux cas étaient répertoriés chaque année. L'O.M.S. constate aujourd'hui une extension de la zone d'endémie et une nette augmentation du nombre de cas signalés. Ainsi, la fréquence annuelle globale est estimée à 1,5 à 2 millions de nouveaux cas, dont 1 à 1,5 millions de cas de leishmaniose cutanée et 500 000 cas de leishmaniose viscérale. (1)

## I. GENERALITES

### 1. Position systématique et répartition géographique

Les leishmanioses sont des affections dues à des protozoaires flagellés de la famille des *Trypanosomatidae* appartenant au genre *Leishmania* Ross, 1903 (Figure 1).

Il existe un grand nombre d'espèces répandues dans deux vastes régions du globe : l'Ancien Monde (pourtour du bassin méditerranéen, Proche, Moyen et Extrême-Orient, Afrique à l'exception de l'Afrique du Sud) et le Nouveau Monde (Amérique Centrale et du Sud) (Figure 2).

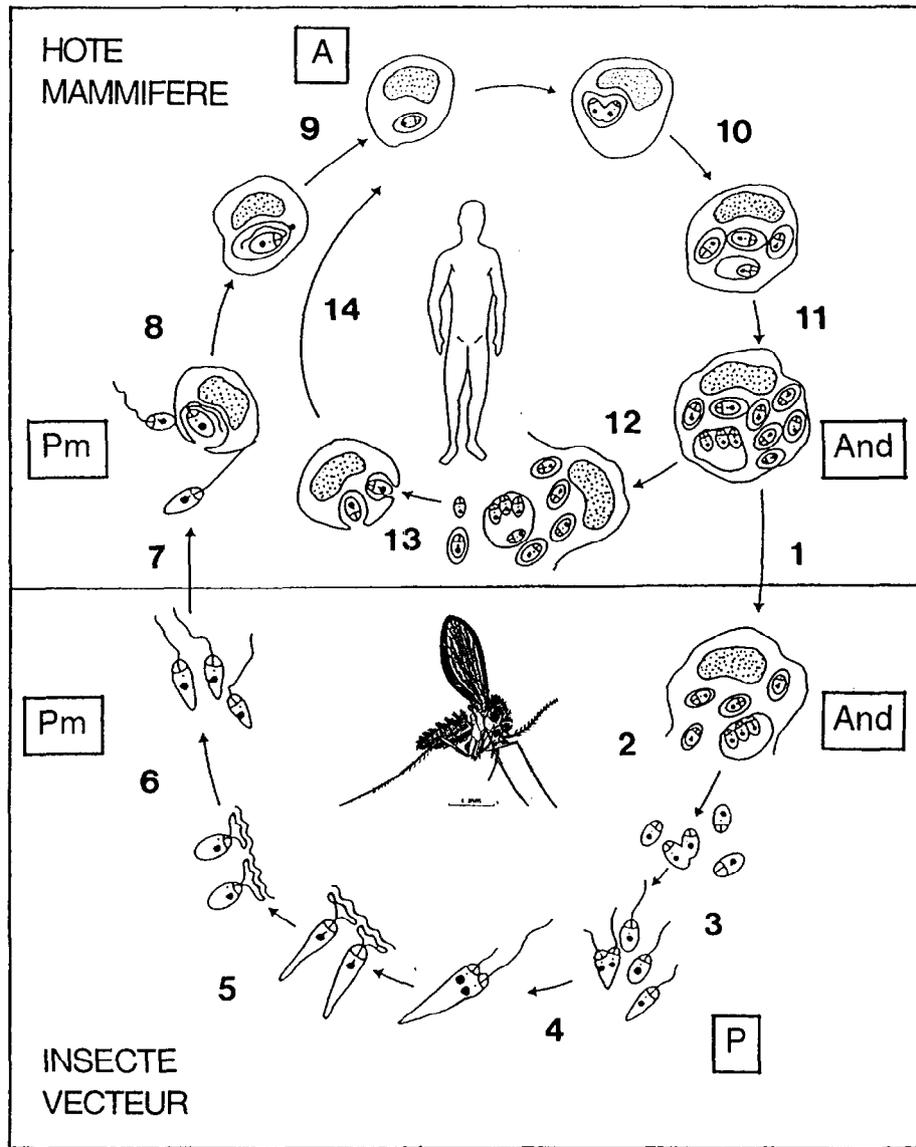
Les leishmanies sont toutes transmises par des insectes Diptères, appartenant à la sous-famille des *Phlebotominae*.

La position du parasite dans le tube digestif de l'insecte vecteur a permis de diviser le genre *Leishmania* Ross, 1903 en deux sous-genres, *Leishmania* s.s. redélimité par Safjanova, 1982 et *Viannia* Lainson et Shaw, 1987. L'orientation du diagnostic de sous-genre est d'une indication très précieuse en Amérique du Sud.

### 2. Cycle évolutif des leishmanies

Les leishmanies sont des parasites hétéroxènes dimorphiques dont le cycle évolutif se partage entre deux hôtes (Figure 3 A). L'un est un hôte vertébré (homme, canidés et rongeurs...) et l'autre est un hôte vecteur, le phlébotome (Diptère Nematocère de la famille des *Psychodidae*) rencontré sur l'ensemble de la zone intertropicale tempérée de la planète. Sur 500 espèces de phlébotome environ 30 sont considérées comme vecteur de leishmaniose. La présence d'hôtes canidés et rongeurs constitue, de plus, des réservoirs naturels posant un problème dans la lutte contre cette endémie.

A. *In vivo*



B. *in vitro* (exemple: *Leishmania amazonensis*)

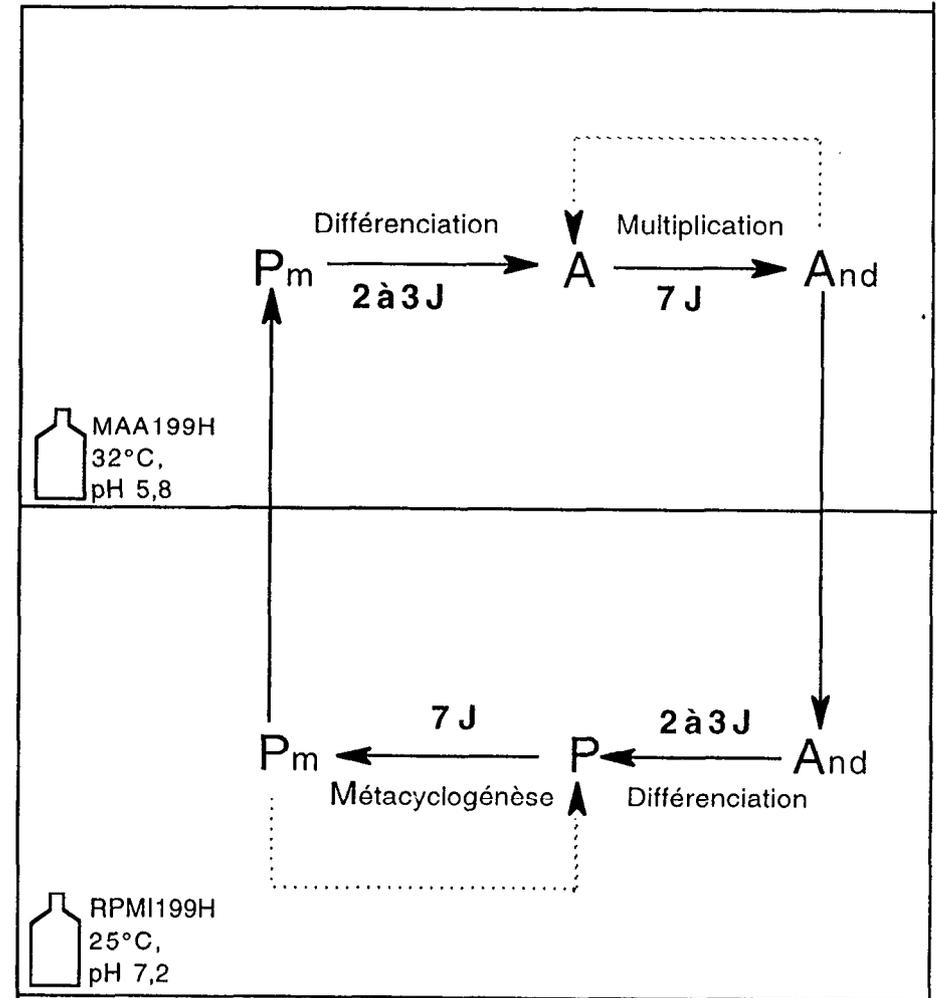


Figure 3: Cycle *in vivo* (modifié d'après Chang K.P. *et al*, 1985) et *in vitro* (Lemesre J.L., Brevet N°94/00577) de *Leishmania*. (P= promastigotes, A= amastigote, m= métacyclique, nd= de non division en phase stationnaire)

Chez le phlébotome, les leishmanies colonisent la lumière du tube digestif sous leur forme promastigote fusiforme (10 à 20  $\mu\text{m}$ ), mobile, dotée d'un flagelle antérieur. Chez le mammifère, elles se présentent sous leur forme amastigote ronde ou ovoïde (2 à 6  $\mu\text{m}$ ), sans flagelle et immobile, se multipliant à l'intérieur des phagolysosomes des macrophages.

L'insecte vecteur femelle s'infeste au cours d'un repas sanguin pris sur l'hôte par ingestion de macrophages parasités (Figure 3, A ,1). Les amastigotes ingérés (2) vont se différencier en promastigotes (3) dans le tube digestif du phlébotome. Ceux-ci, au cours de la métacyclogénèse, vont se multiplier activement (4) et subir une maturation (5) en promastigotes métacycliques infectieux. Le cycle chez le phlébotome se termine par une migration antérograde du parasite, dès le quatrième jour suivant le repas sanguin. Les formes infestantes s'accumulent ainsi au niveau des pièces buccales de l'insecte (6).

La transmission de l'insecte au mammifère se fait par l'inoculation de ces promastigotes métacycliques lors d'une piqûre (7). Ces formes promastigotes vont être phagocytées (8) par les cellules du système réticulo-histiocytaire (cellules monocytaires: monocytes, histiocytes et macrophages) à l'intérieur desquelles elles se différencient en formes amastigotes (9). Ces dernières se multiplient activement (10,11) à l'intérieur des phagolysosomes ou vacuole parasitophore, jusqu'à provoquer la lyse de la cellule-hôte (12), permettant ainsi aux amastigotes libérés de réinfester d'autres macrophages (13) et donc à la maladie de se propager (14).

### 3. Aspect clinique de la maladie

La plupart des leishmanioses sont des zoonoses, c'est à dire des maladies d'animaux domestiques, commensaux ou sauvages. Ces animaux constituent les "hôtes réservoirs" à partir desquels l'homme est infecté. Seuls le *kala-azar* indien dû à *L. donovani* et les formes cutanées à *L. tropica* sont considérées comme des anthroponoses, c'est à dire des affections intrahumaines. Ce sont des maladies opportunistes du SIDA.

Bien que la plupart des parasites produisent un large spectre de maladies plutôt qu'une simple forme clinique, ces affections ont été regroupées en trois groupes prépondérants :

- les leishmanioses cutanées, bénignes;
- les leishmanioses cutanéomuqueuses, mutilantes;
- les leishmanioses viscérales, mortelles en l'absence de traitement.

Elles sont dues respectivement à l'accumulation précoce des parasites dans les cellules du système réticulo-histiocytaire, soit de la peau et des muqueuses, soit des organes profonds (foie, rate, moelle osseuse).

Notre modèle d'étude, *Leishmania amazonensis*, est une espèce du complexe *L. mexicana* et constitue l'agent étiologique de la leishmaniose cutanée-diffuse du Nouveau Monde. Elle provoque des lésions cutanées simples, ou multiples par métastases à partir du point d'inoculation. Chez environ 30 % des patients présentant des lésions causées par ce parasite, une leishmaniose cutanée-diffuse est observée. Dans ce cas, une absence de réponse immunologique à médiation cellulaire et la présence de très nombreux macrophages parasités et vacuolisés sont caractéristiques. Cette leishmaniose sévit de manière endémique au Brésil, au Pérou, en Bolivie, en Colombie et en Guyane

Française (Figure 1). C'est une leishmaniose cutanée zoonosique (O.M.S., 1990 (2)) qui touche essentiellement les rongeurs sylvestres. L'homme s'infeste par "intrusion" dans le cycle sylvatique.

## II. ELEMENTS NECESSAIRES A LA COMPREHENSION DE L'ETUDE ET OBJECTIFS

### 1. Les protéases des leishmanies

#### 1.1. Introduction

Les protéases sont des enzymes intervenant dans de nombreux processus biologiques chez la plupart des organismes vivants. Durant ces dix dernières années, un intérêt particulier a été porté à ces activités enzymatiques chez les parasites. Il semble en effet que certaines protéases soient des molécules-clés intervenant dans le métabolisme des parasites et qu'elles puissent jouer un rôle important dans leur pathogénicité, leur virulence et dans les interactions hôte-parasite (3). Elles représentent donc des cibles moléculaires intéressantes en immunothérapie et en chimiothérapie. (3,4)

De plus, les protéases pourraient être impliquées dans l'activation de pro-protéases (5), dans l'élimination de protéines dégradées ou non désirables et dans le remodelage cellulaire durant les processus de différenciation ou de maturation intervenant au cours du cycle de développement parasitaire (3). Enfin certains protozoaires parasites sécrètent abondamment des activités protéasiques. Chez les trypanosomatidés, il est suggéré pour l'instant que ce soient les protéases provenant de la lyse parasitaire qui soient responsables de certains effets pathogènes (6).

Quatre types d'activité protéasiques se distinguent en fonction de la nature des acides aminés qui constituent leur site actif : les aspartates-, les sérines-, les cystéines- et les métalloprotéases (à zinc) (3).

Chez les leishmanies, deux types d'endopeptidases ont été mises en évidence. Ce sont principalement les protéases à cystéine (4), mais également des métalloprotéases dont la gp 63 (7). Plus récemment deux exopeptidases différentes ont été décrites chez les formes promastigotes des leishmanies : une aminopeptidase et une carboxypeptidase solubles (8).

#### 1.2. La métalloprotéase majeure de surface des promastigotes ou gp63

La gp63, glycoprotéine de 60 à 65 kDa, est la protéase majeure ( $5 \times 10^5$  copies par cellule) de surface des promastigotes ("Promastigote Surface Protease", PSP) (9) qui a été identifiée chez 15 espèces de leishmanies (10) ainsi que chez deux trypanosomatidés monogènes (*Crithidia fasciculata* et *Herpetomonas samuelpessoai*) (11). C'est une métalloprotéase à zinc (7) inhibée par des agents chélateurs tels que la 1-10 phénanthroline ou le zinc (10). Cette protéase présente de nombreuses caractéristiques communes avec les métalloprotéases de la matrice extracellulaire (12).

L'ancrage de cette protéase à la membrane des promastigotes est assuré par un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) et son pH d'activité optimal est compris entre 7 et 10 (13). Cependant, une controverse à propos de son activité plus faible à pH acide chez *L. amazonensis* existe (14). En fait, il est possible que son pH optimal dépende du substrat utilisé lors des expériences *in vitro* (15). Bien qu'exprimée par les formes amastigotes de différentes espèces de leishmanies, la présence d'une gp63 à la surface des amastigotes reste à démontrer. Ainsi, chez *L.*

*mexicana*, la gp63 serait peu présente à la surface des amastigotes et son ancrage à la membrane ne serait pas assuré par un GPI (16) mais par un long carboxy-terminal hydrophobe transmembranaire (17). Chez la forme amastigote, contrairement à la forme promastigote, la gp63 aurait de plus des propriétés hydrophiles et une localisation lysosomale, où son activité à pH acide serait optimale (18). Certains auteurs l'ont aussi localisée dans la poche flagellaire des amastigotes (19). En fait, un polymorphisme autant génétique que dû à des modifications postraductionnelles, tels que des degrés variables de N-glycosylation, serait responsable de la présence de différentes isoformes de la gp63 au niveau des deux stades parasitaires.

La gp63, dont le rôle exact reste encore à démontrer, pourrait intervenir en tant que facteur de virulence tout comme le lipophosphoglycane ou LPG, autre molécule très présente à la surface des promastigotes. En effet, outre son implication directe dans les mécanismes d'attachement aux macrophages par des interactions spécifiques de type ligands-récepteurs, notamment via une séquence RGDS-like, SRYD (20), plusieurs études ont confirmé sa participation dans les étapes ultérieures de l'établissement du parasitisme. La transfection de formes promastigotes exprimant peu de gp63 à leur surface avec des plasmides contenant le gène de la gp63 favorise l'attachement et la survie des parasites au niveau des macrophages (21). De plus par son activité protéolytique la gp63 pourrait protéger le parasite de son environnement : sucs digestifs du vecteur et sang de l'hôte mammifère pour les promastigotes et contre les hydrolases lysosomales pour les amastigotes. En effet, des travaux récents (15) ont montré que cette enzyme pouvait être impliquée dans la survie des amastigotes contre leur cytolysse dans les phagolysosomes des macrophages. En effet, la présence de 1-10 phénanthroline, inhibiteur spécifique des métalloprotéases, dans le phagolysosome provoque la lyse des parasites à l'intérieur du phagolysosome, suggérant que des protéases de cette famille pourraient être impliquées dans la survie intracellulaire du stade amastigote des leishmanies. De plus, des liposomes exprimant la gp63 native d'amastigotes ou de promastigotes à leur surface étaient protégés contre la dégradation intralysosomale. Mais ces rôles ne seront pas démontrés tant que des incertitudes concernant le substrat et le pH optimal d'activité de cet enzyme ainsi que sa présence chez les amastigotes ne seront pas clairement élucidés.

De part ses propriétés immunologiques caractéristiques et notamment en tant qu'immunogène majeur de surface (22), la gp63 a fait l'objet de nombreuses études vaccinales. Les résultats obtenus sont très contradictoires : aucune protection n'a été obtenue chez les lignées de souris BALB/C immunisées avec une gp63 recombinante de *L. major* (23). Cependant, une étude récente utilisant un vaccin recombinant consistant à faire exprimer le gène de la gp63 dans le BCG semble très prometteuse (24). Enfin, la gp63 semble jouer un rôle aussi dans la modulation de la réponse immune de l'hôte. Pour l'instant, il a été montré qu'elle clivait des molécules CD4 de cellules T humaines (25).

### 1.3. Les protéases à cystéine

Les protéases qui ont été les plus étudiées chez les trypanosomatidés appartiennent à la classe des cystéine-protéases. Chez les leishmanies, elles s'expriment principalement chez la forme amastigote et semblent restreintes aux espèces responsables de leishmanioses cutanées. Elles possèdent en général une localisation intracellulaire particulière puisqu'elles sont rencontrées à

l'intérieur d'un organite apparenté au lysosome encore appelé mégasome (4). Un complexe d'enzymes solubles de masses moléculaires allant de 16 à 36 kDa exprimant à pH acide des activités cystéine-protéases, a été mis en évidence chez les formes amastigotes de *L. mexicana*. Celles-ci représentaient 90 % de l'activité protéasique totale du stade amastigote.

Des études moléculaires permettent actuellement de distinguer l'existence de trois classes de gènes correspondant à trois types d'activités cystéine-protéases, apparentées à la famille des cathepsines B et L des mammifères (26, 27).

Les enzymes de types I ont fait l'objet de nombreuses études parce qu'elles présentent de fortes activités et parce qu'elles possèdent une spécificité de stade parasitaire marquée, non seulement chez différentes espèces de leishmanie, mais aussi chez *Trypanosoma cruzi* (28,29,30). Elles sont exprimées spécifiquement par le stade amastigote de l'hôte mammifère chez *L. mexicana* alors que chez *T. cruzi* les plus fortes activités sont supportées par les formes épimastigotes de l'insecte vecteur. Elles sont caractérisées par une longue extension carboxy-terminal riche en résidus proline, serine et thréonine (29) qui est en grande partie coupée durant un processus post-transcriptionnel chez *L. pifanoi* (31). Ce carboxy-terminal serait responsable du routage des enzymes vers le mégasome, de l'inhibition de leur activité (31). Chez *Leishmania* comme chez *T. cruzi*, certaines enzymes du type I auraient aussi une localisation membranaire (31). Ce type d'enzymes a aussi été détecté dans l'espace extracellulaire d'une lésion développée chez une souris infectée par *L. mexicana*, où sa présence semble due, d'après les auteurs, à une lyse parasitaire (6).

Les gènes de type I chez *L. mexicana* ont 19 copies arrangées en tandem (32). Leur complexité ainsi que les fortes activités des enzymes correspondantes laisse présager de leur importance. Déjà en 1989, Alfieri *et al.* (33) montraient qu'il existait une bonne corrélation entre l'inhibition des cystéine-protéases par des esters d'acides aminés, notamment l'ester méthylé de la L-leucine et l'activité leishmanicide chez des macrophages infectés par *L. amazonensis*. Plus récemment, des expériences de délétion du gène de type I chez *L. mexicana* ont donné des résultats controversés. En effet, l'infectivité *in vitro* vis à vis de macrophages du mutant nul correspondant était significativement réduite. Mais ce mutant était capable d'infecter des souris de la même façon que la souche sauvage (32).

Les cystéine-protéases de types II et III ont été mises en évidence uniquement chez les leishmanies. La transcription de leur gène respectif semble réguler au cours du cycle de développement parasitaire de *L. mexicana* (27, 34, 35) Les enzymes de type III sont apparentées aux cathepsines B de mammifères. Le rôle de ces enzymes est encore inconnu.

Enfin les cystéine-protéases sont aussi capables de moduler les mécanismes de défense de l'hôte. Les leishmanies à l'intérieur des macrophages internalisent les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité et les dégradent avec leur propres protéases, limitant ainsi la présentation des antigènes parasites au système immunitaire (36). Les cystéine-protéases sont aussi capables de moduler la production des cytokines de façon à favoriser la prolifération des parasites. Elles stimulent l'expression du gène de l'IL-4 (37) et contribuent aussi à la sécrétion de grande quantité d'IL-1 par les macrophages infectés, favorisant la différenciation de précurseurs CD4+ vers un phénotype Th2, qui exacerbe l'infection. Les macrophages infectés par les leishmanies sécrètent en grande quantité du TGF- $\beta$  qui active la réplication des formes amastigotes en inhibant

l'expression de la NO synthase (38). Il est possible que les cystéine-protéases soient aussi impliquées dans la production de cette cytokine, comme c'est le cas chez *T. cruzi* (39).

## 2. Les facteurs d'excrétion-sécrétion

### 2.1 Les facteurs d'excrétion-sécrétion chez les leishmanies

L'examen de la littérature nous montre que peu d'études ont été réalisées concernant les facteurs d'excrétion-sécrétion des leishmanies, contrairement aux abondants travaux réalisés à propos des antigènes de surface de ces parasites.

Greenblatt et Glaser furent les premiers à mettre en évidence ces facteurs en 1965 (40). Ils portèrent leur attention sur l'accumulation d'un matériel d'assez haut poids moléculaire dans le milieu de culture des formes promastigotes. Puis, dans les années 1970, les chercheurs s'aperçurent que ce matériel d'assez haut poids moléculaire pouvait réagir avec des anticorps (41,42,43,44) et qu'il pouvait donc être utilisé afin de sérotyper des souches (45). Les termes ES ou EF (ES= excreted substance ou EF = excreted factor) commencèrent alors à être utilisés. Mais de nombreux travaux portant sur le même thème montraient une ambiguïté: en effet, soit la sécrétion de ces facteurs intervenait dans un contexte biologique naturel (46), soit ces facteurs étaient obtenus dans un contexte de stress physique, chimique, environnemental (47,41). Ainsi, la plupart des travaux portant sur l'étude de ces ES l'ont été sur des facteurs non naturellement excrétés. Ces ES étaient identifiés en tant que carbohydrates (composé riche en carbohydrates chargé négativement (41), facteur "immunologiquement" actif riche en carbohydrates (43) ou glycoprotéine (glycoprotéine antigénique active (AAGP) (44). D'autres auteurs ont également utilisés les termes d'exométabolite (48) ou plus tard d'exoantigène (EA) (49).

Dans les années 80, de nouvelles approches ont permis de mieux caractériser ces facteurs excrétés-sécrétés et de mieux appréhender leurs différents rôles biologiques. Deux molécules ont pu être identifiées chez les promastigotes de différentes espèces de leishmanies (50) : principalement l'acide phosphatase (AcP) et le phosphoglycane, molécule relarguée du lipophosphoglycane (ou d'une partie).

L'AcP semble être la protéine majeure sécrétée par les formes promastigotes *in vitro* (51,52) à partir, semble-t-il, de la poche flagellaire (53). Son activité peut être révélée par l'hydrolyse de son substrat (p-nitrophénol phosphate en présence de sodium acétate) et l'analyse de l'absorbance du produit à 410 nm (53). Pour Ilg (54) chez *Leishmania mexicana*, l'AcP est un polymère filamentueux de phosphoglycoprotéine contenant 75% de carbohydrates, 13% de protéine et 13% de phosphates correspondant à une masse moléculaire de 100 kDa. Chez *Leishmania donovani*, c'est une glycoprotéine d'environ 139 kDa (51). On peut donc supposer que ces carbohydrates et glycoprotéines citées précédemment sont en fait des acides phosphatases (plus ou moins altérés). Néanmoins la mise en évidence d'activité enzymatique est rendue difficile car de nombreuses altérations des molécules sont provoquées par l'extraction et la purification des ES (47), sauf en ce qui concerne l'activité de l'acide phosphatase qui résiste aux nombreux traitements chimiques qui lui sont imposés.

Une autre molécule également très étudiée chez les leishmanies est le lipophosphoglycane, (LPG) (55) qui est avec la gp63, la principale molécule exposée à la surface (glycocalyx) des

promastigotes. Ce LPG, qui peut être relargué dans le milieu de culture sous forme de phosphoglycane (PG) (52), a donc aussi été étudié en tant que ES. Ilg *et al* (56) révèlent la présence de LPG dans le surnageant de milieu de culture des formes promastigotes. Ils observent aussi une forte conservation de ce LPG entre différentes espèces de *Leishmania* avec quelques petites différences au niveau de la structure de la branche de l'oligosaccharide phosphorylée, qui ont pu servir dans l'établissement des sérotypes (45).

Ces produits d'excrétion-sécrétion (PES) semblent posséder la capacité d'agir sur les cellules périphériques du sang et sur la réponse immunitaire en ralentissant la différenciation des monocytes, et moins significativement, celle des lymphocytes (57)

D'autres rôles biologiques potentiels ont été avancés mais n'ont pas été vraiment démontrés:

- Initiation et maintien de l'infection parasitaire dans les macrophages (58);
- Survie intracellulaire des amastigotes (59);
- Rôle dans la nutrition du parasite de l'acide phosphatase (51);
- Pénétration par lyse de la membrane péritrophique chez le phlébotome grâce à une chitinase (et une N-acétylglycosaminidase) (60).

Ces PES sembleraient donc intervenir dans les mécanismes d'infection et de défense mis en oeuvre par le parasite, en assurant la protection du parasite dans le milieu intracellulaire et l'échappement du parasite au système immunitaire, ainsi que la survie de l'amastigote dans la vacuole parasitophore du macrophage, notamment par l'action de protéases parasitaires envisagée par Duboise *et al* (31). Un blocage des enzymes lysosomales par des facteurs excrétés-sécrétés était déjà envisagé en 1977 par Lewis et Peters (61).

## 2.2. Sécrétion de protéases

La sécrétion de protéases à cystéine a été observée chez des protozoaires tels que *Trichomonas vaginalis* ou *Entamoeba histolytica*. (3). Chez ce dernier, ces protéases sont apparentées aux cathepsines B et sont en fait des facteurs de virulence qui présentent des homologies structurales avec les enzymes extracellulaires des cellules tumorales invasives (62).

Chez les leishmanies, ces protéases à cystéines pourraient donc être responsables des lésions tissulaires observées lors de leishmanioses cutanées, notamment lors de leishmanioses cutanées-diffuses caractérisées par la présence de très nombreux macrophages fortement vacuolisés au niveau des lésions. Mais la sécrétion de protéases n'a pu être démontrée chez les leishmanies. Cependant, Ilg *et al*, en 1994 (6), ont observé la présence de protéases à cystéine au niveau des lésions de souris infectées. Les auteurs ont expliqué la présence de ces protéases au niveau des lésions par la mort des parasites dans la vacuole des macrophages. Deux autres hypothèses étaient envisagées: la libération des protéases à cystéines cellulaires de l'amastigote par rupture du parasite, notamment par l'extraction tissulaire ou, peut-être, la sécrétion de ces protéases par les formes amastigotes. Cette dernière hypothèse était écartée du fait de la non observation de protéines dans les milieux de culture. Cependant, Duboise *et al* (31) ont pu observer la faible présence de protéases à cystéine dans le milieu de culture de formes amastigotes de *L. pifanoi*.

### 3. Objectifs de l'étude

Durant ces dernières années, l'Unité de Biologie Parasitaire du Centre ORSTOM de Montpellier a acquis des compétences concernant:

- la culture continue en condition axénique du stade parasitaire médicalement important des leishmanies, la forme amastigote;
- la caractérisation morphologique, biochimique, immunologique et biologique des formes amastigotes de culture en comparaison avec les formes amastigotes intracellulaires correspondantes, validant ainsi ce nouveau modèle expérimental de culture;
- la réalisation *in vitro* du cycle évolutif de certaines espèces de leishmanies en condition axénique et, depuis peu, en condition asérique dans des milieux de culture complètement définis sans macromolécule (figure 3,B).

Peu d'études concernant les facteurs d'excrétion sécrétion des leishmanies ont été réalisées et ceci en contradiction avec l'importance des propriétés biologiques qui leur sont attribuées. En fait, l'obtention d'une source propre et abondante de facteurs d'excrétion sécrétion parasites est actuellement délicate du fait de la présence dans les surnageant de culture classique de grandes quantités de contaminants sériques et parfois cellulaires, limitant bon nombre d'études.

L'établissement en milieu complètement défini du cycle de développement parasitaire de certaines espèces de leishmanies et notamment de *L. amazonensis* a contribué à approcher biochimiquement les polypeptides et les activités protéasiques excrétées-sécrétées naturellement au cours des principales séquences du cycle de développement parasitaire.

Nous nous proposons d'analyser l'expression différentielle des activités protéasiques cellulaires et excrétées-sécrétées non seulement au cours des différentes phases de la croissance des formes promastigotes et amastigotes de *L. amazonensis* mais aussi durant la différenciation d'un stade parasitaire en un autre.

La mise en évidence de certaines protéases, qu'elles soient constitutives des parasites et/ou sécrétées par ceux-ci, dont l'expression serait associée aux processus de prolifération, de maturation et de différenciation parasites, permettrait de cibler rapidement des molécules pouvant potentiellement contrôler ces phénomènes.

## III. MATERIEL ET METHODES

### 1. Obtention du matériel parasitaire

#### 1.1. Cultures *in vitro* de *L. amazonensis*

La souche de *Leishmania amazonensis* utilisée dans notre étude porte la référence O.M.S.: MHOM/BR/76/LTB-012 ( caractérisée par analyse isoenzymatique). Cette souche a été isolée au Brésil chez un patient atteint de leishmaniose cutanée-diffuse.

Les formes promastigotes et amastigotes sont cultivées en condition axénique dans des milieux de culture complètement définis ayant la particularité de ne contenir aucune macromolécule en tant que substitut sérique. Le matériel parasitaire issu de ces cultures est donc dépourvu de tout contaminant cellulaire et sérique (Lemesre, Brevet PCT/FR N°94/00577). Les deux stades du parasite sont

maintenus en culture continue par repiquages hebdomadaires de  $5 \times 10^5$  parasites par ml dans le milieu de culture RPMI 199H pH 7,2, à 25°C, pour les formes promastigotes et dans le milieu MAA 199H pH 5,8, à 32°C, pour les formes amastigotes . La production semi-massive des parasites est réalisée progressivement par inoculation des organismes dans des boîtes de volume supérieur : 25 cm<sup>2</sup> (5 ml de volume de culture), 75 cm<sup>2</sup> (50 ml) et 150 cm<sup>2</sup> (200 ml), dans les mêmes conditions d'inoculum et de volume d'aération. Selon des critères morphologiques, biochimiques, biologiques et immunologiques les formes parasitaires issues de cultures asériques présentent une bonne analogie avec les formes de culture sériques correspondantes (Lemesre, Brevet PCT/FR N°94/00577).

La différenciation de promastigotes en amastigotes vient compléter la réalisation *in vitro* du cycle de développement parasitaire de *L. amazonensis* en condition axénique et asérique. Elle est réalisée en inoculant  $10^6$  promastigotes de phase stationnaire par ml dans le milieu de culture MAA199H, pH 5,8 à 32°C. Les nouvelles conditions de pH, de température et de nutriments induisent la transformation parasitaire.

La concentration parasitaire, est déterminée par comptage des parasites préalablement fixé en présence de 0,1 % de glutaraldéhyde en microscopie photonique au grossissement 400 sur cellule de Thoma. Les pourcentages de différenciation des parasites sont déterminés par comptage sur frottis parasitaires, après fixation au méthanol et coloration au Giemsa, du nombre de formes amastigotes et promastigotes sur 500 parasites.

Les cinétiques de culture *in vitro* ont été réalisées avec des parasites ayant subi moins de 5 repiquages en culture et dans des volumes de 100 ml de milieu de culture

La conservation des deux stades parasitaires est assurée par cryocongélation des organismes en culture en présence de 3% de DMSO (Diméthylsulfoxyde), à -180°C dans l'azote liquide.

## 1.2. Récolte du matériel parasitaire

Les formes promastigotes et amastigotes sont récoltées à différentes étapes du cycle de développement parasitaire par centrifugation des cultures parasitaires à 3000g pendant 15 min à 4°C. Les culots parasitaires et les surnageants de culture ainsi dissociés sont traités séparément par la suite selon le schéma expérimental représenté à la figure 4.

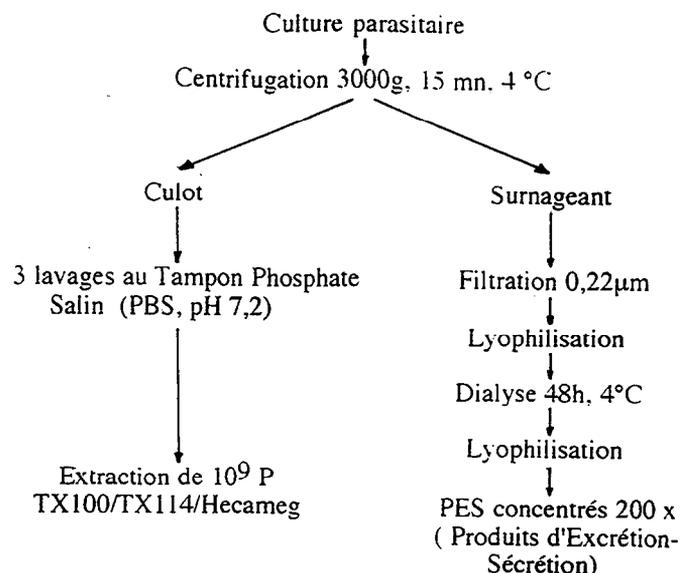


Figure 4: Obtention du matériel parasitaire

### **1.3. Préparation des lysats parasitaires**

Le culot parasite est lavé 3 fois en tampon phosphate salin (PBS 0,01 M, pH 7,2) dans les conditions de centrifugation décrites précédemment. Après le dernier lavage, le nombre de parasites récoltés est déterminé par comptage à l'hématimètre de Thoma au grossissement 400.

Des culots de  $10^9$  parasites peuvent être stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation.

#### 1.3.1. Préparation des extraits polypeptidiques totaux

$10^9$  parasites lavés sont resuspendus dans une solution de lyse hypotonique Tris 50 mM, pH 8, contenant 1% de Triton X100 (Sigma). Après 20 min d'incubation à  $4^{\circ}\text{C}$ , une centrifugation de 20 min à  $4^{\circ}\text{C}$  et à 8000g permet de séparer le matériel insoluble (débris membranaire) du surnageant (molécules solubles et solubilisées). Ce surnageant, correspondant à un extrait polypeptidique total (EPT), est aliquoté et conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

#### 1.3.2. Solubilisation des protéines membranaires par séparation de phases au triton X114

Le principe de la séparation de phase au Triton X114 repose sur les propriétés de solubilité de ce détergent non ionique en fonction de la température permettant de séparer les molécules amphiphiles de celles hydrophiles.

$10^9$  parasites lavés sont resuspendus dans une solution de TBS (Tris HCl 10 mM, 150 mM NaCl), pH 7,4 contenant 2% de Triton X114, préalablement condensé, pendant 10 min à  $4^{\circ}\text{C}$  pour induire une solubilisation homogène des protéines, puis sont centrifugés à 10 000g pendant 45 min à  $4^{\circ}\text{C}$  afin d'éliminer le matériel insoluble ( $\alpha$ ,  $\beta$ -tubuline). Le surnageant est déposé sur du sucrose à 6% dans du TBS, mis à incuber à l'étuve à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 15 min afin d'induire la séparation de la phase enrichie en Triton X114 de celle pauvre en détergent dite de phase aqueuse. La phase inférieure détergente contenant les protéines amphiphiles est séparée à température ambiante de la phase aqueuse supérieure contenant les protéines hydrophiles par faible centrifugation (52 g). Les deux phases sont conservées en aliquots à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **1.4. Concentration des molécules d'excrétion-sécrétion à partir du surnageant de culture**

La préparation des produits d'excrétion-sécrétion est résumée dans la figure 4. Cinquante millilitres de surnageant métabolisé par les parasites sont filtrés sur membrane Millipore de  $0,22\ \mu\text{m}$  (élimination éventuelle de quelques parasites encore en suspension après centrifugation) puis congelés en coquille avant d'être lyophilisés. Les lyophilisats sont repris dans 6 ml d'eau milliQ pour être dialysés 48 h à  $4^{\circ}\text{C}$  contre de l'eau milliQ de façon à éliminer les sels. Une seconde lyophilisation permettra de concentrer le surnageant de 100 à 1000 fois suivant les analyses à réaliser. Cette fraction, appelée produits d'excrétion-sécrétion (P.E.S), est aliquotée et conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **1.5. Dosage protéique**

Le dosage des protéines est réalisé à l'aide du spectrophotomètre Beckman DU-600, à 595 nm selon la méthode de Bradford, en utilisant le réactif Biorad (Biorad Pratin Assay Kit 11). Une gamme

étalon, de 5 à 20 µg/ml, est préparée à partir d'une solution standard d'albumine bovine (BSA 1 mg/ml, Sigma).

## **2. Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide**

### **2.1. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)**

L'analyse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE a été réalisée selon le protocole décrit par Laemmli *et al*, 1970 (63) dans une cuve d'électrophorèse de type mini gel (Bio-rad). Les pourcentages d'acrylamide utilisés sont de 5 % pour le gel de concentration et de 10 % pour le gel de migration, ce qui permet de séparer les protéines de 10 à 200 kDa.

Les extraits protéiques sont mélangés (v/v) avec du tampon échantillon contenant 4 % de SDS (responsable des conditions dénaturantes) 20% de glycérol et 0,5% de bleu de bromophénol (pour suivre le front de migration) dans du Tris HCl 125 mM, pH 6,8. En condition réductrice, 20% de β-mercapto-éthanol sont ajoutés au tampon échantillon et les échantillons sont chauffés 3 min à 100°C.

La migration électrophorétique s'effectue dans un tampon (Tris 2,5mM / glycine 19,2 mM, pH 8,3) contenant 0,1% de SDS (conditions dénaturantes) sous un voltage constant de 70V à 4°C. L'étalonnage du gel est obtenu par le dépôt, dans deux puits réservés, de 5 µg de protéines de poids moléculaires connues, standards (Marck 12 MW standard, See-Blue Pre-stained standards Novex). Les distances parcourues (d) par ces protéines par rapport aux protéines de référence dans les gels permettent de tracer une droite d'étalonnage : mobilité relative = f(log du poids moléculaire), et donc de déterminer les poids moléculaires apparents des molécules étudiées.

### **2.2. Révélation des protéines au nitrate d'argent**

Après élimination du SDS par lavage en présence d'acide acétique (10 %) et d'éthanol (40 %), l'acide acétique est ensuite lui-même éliminé par deux rinçages de courte durée dans 50 % d'éthanol. Puis les gels sont mis à incuber pendant 15 min dans le mélange de coloration : AgNO<sub>3</sub> 19,4%-NaOH 0,36%. Après cinq lavages dans l'eau, une solution de révélation contenant du formaldéhyde à 0,02 % dans de l'acide citrique à 1 % (P/V), fait apparaître sur le gel les protéines. Le seuil de sensibilité de cette méthode de coloration est de 2 ng équivalent protéine.

## **3. Détection et caractérisation des activités protéasiques**

### **3.1. Gel d'empreinte**

La technique est basée sur la séparation à 4°C d'extraits protéiques en condition non réductrice dans un gel de polyacrylamide SDS-PAGE contenant 0,7% de gélatine copolymérisée. Les extraits protéiques, non réduits, sont déposés à raison de 5 à 10 µg équivalent protéine par puit . Après migration les gels sont incubés dans un tampon de renaturation contenant 2,5% de Triton X-100 (un détergent non ionique éliminant le SDS) soit dans du tampon phosphate pH 7,2, soit dans du tampon acétate pH 5,5. Puis les gels sont mis à incuber toute la nuit dans le tampon homologue dépourvu de détergent mais pouvant contenir ou non 1 mM de Dithiothréitol (Sigma), réducteur qui stabilise les fonctions thiols et permet aux enzymes, notamment aux cystéine-protéases de retrouver toute leur activité.

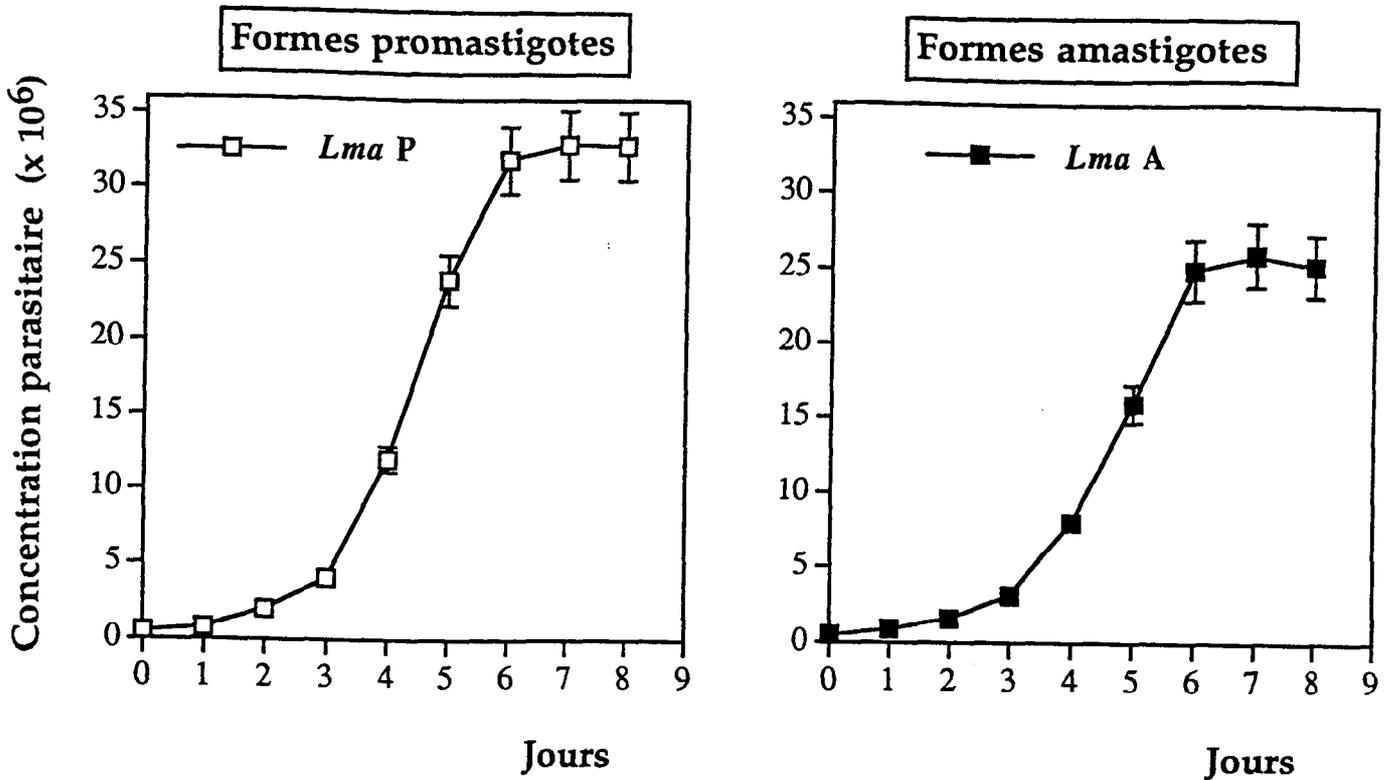
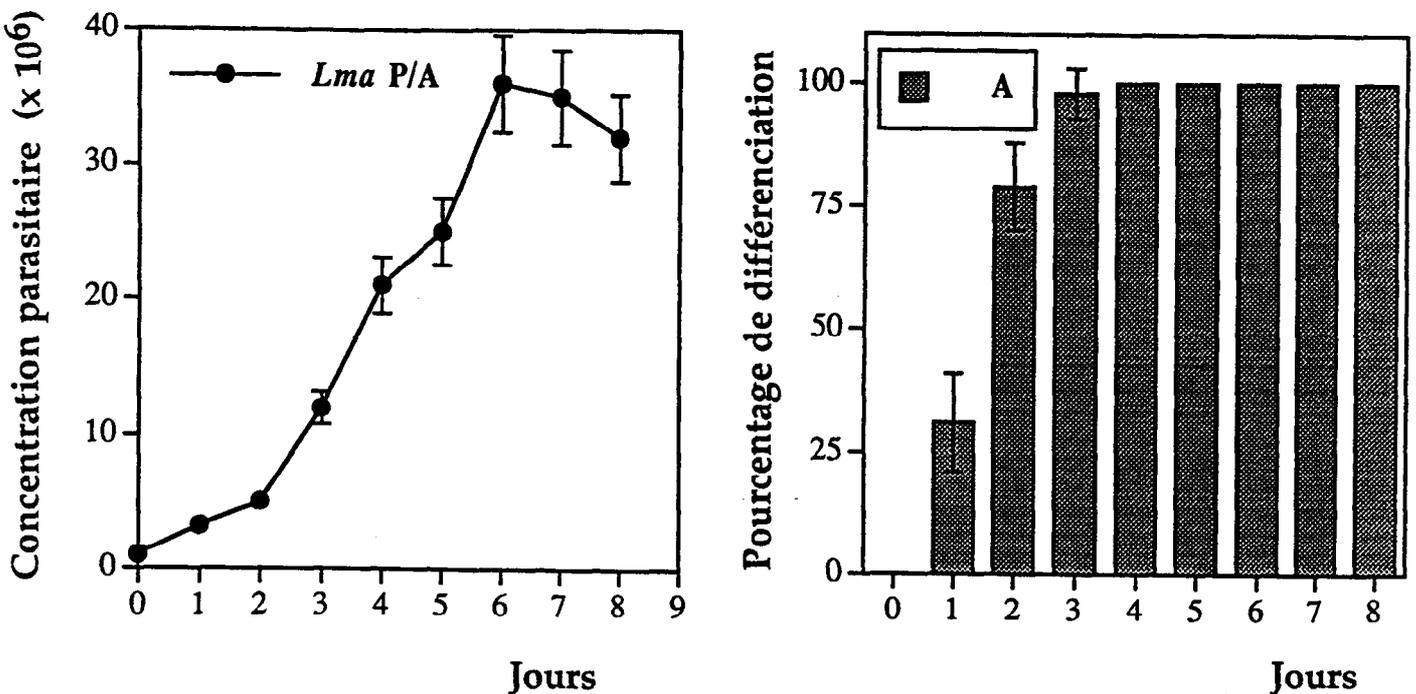
**A****B**

Figure 5 : Concentrations parasites et pourcentage de différenciation de la forme promastigote en forme amastigote lors de cinétiques de culture *in vitro* de *Leishmania amazonensis* :

A : culture de promastigotes et d'amastigotes dans leur milieu respectif, complètement défini (Lemesre, Brevet PCT/FR N°94/00577) (inoculum de 5 10<sup>5</sup> parasites par ml);

B : différenciation du stade promastigote en amastigote après inoculation de 10<sup>6</sup> promastigotes par ml dans le milieu défini de croissance des amastigotes.

Les protéines à activité protéasiques dégradent la gélatine laissant apparaître une zone blanche après coloration du gel au bleu de Comassie 0,25% contenant 40% de méthanol et 10% d'acide acétique.

### **3.2. Utilisation d'inhibiteurs spécifiques de protéases**

Deux inhibiteurs de spécificité connue vis à vis des métalloprotéases à zinc, la 1-10 phénanthroline, ou des protéases à cystéine, le L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanido)butane (E-64), ont été utilisés afin de déterminer les classes d'activités protéasiques observées sur les gels d'empreinte. Les inhibiteurs sont incorporés aux échantillons, aux tampons de renaturation et d'incubation des gels, un échantillon analysé en l'absence d'inhibiteur servant de témoin.

La 1-10-phénanthroline est utilisée à raison de 1 mM par échantillons et 10 mM dans les tampons d'incubation. Le L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanido)butane (E-64) est ajouté à raison de 10 µmol uniquement dans les solutions d'incubation.

## **IV : RESULTATS**

### **1. Réalisation *in vitro* des principales séquences du cycle de développement parasitaire de *L. amazonensis***

#### **1.1. Cinétiques de culture *in vitro* des formes promastigotes et amastigotes en milieu complètement défini**

Les cinétiques de culture *in vitro* des deux stades parasitaires de *L. amazonensis* réalisées en condition axénique et asérique en milieux complètement définis sont représentées sur la figure 5,A.

La cinétique de croissance des deux stades parasitaires présente les quatre phases caractéristiques de la culture, classiquement décrites chez tous les microorganismes.

- une phase de latence (de J1 à J2) où les parasites se préparent à la division pendant les premiers jours qui suivent leur mise en culture dans un milieu neuf ;
- une phase exponentielle de croissance (de J3 à J6) qui correspond à une phase de prolifération intense. A J5 le parasite est ainsi en pleine phase exponentielle;
- une phase stationnaire ou stade de non division à partir de J6;
- une phase de lyse parasitaire (à J8) qui suit la phase parasitaire.

Quelques différences sont néanmoins observables entre les deux stades parasitaires tant au niveau du temps de doublement qu'au niveau des concentrations à confluence des cultures. En effet, les formes promastigote se multiplient plus rapidement que les formes amastigotes pour atteindre au maximum de la culture une concentration parasitaire supérieure de 20 % par rapport à celles des formes amastigotes .

#### **1.2. Cinétique de différenciation *in vitro* des formes promastigotes en formes amastigotes**

La figure 5,B représente les concentrations parasitaires de *L. amazonensis* et les pourcentages de différenciation obtenus dans le temps lors de la différenciation de promastigotes, inoculés dans le milieu de culture et les conditions de pH et de température des amastigotes. Cette différenciation, pratiquement totale dès le troisième jour, est complète au quatrième jour de la cinétique, les

amastigotes étant alors en phase exponentielle de croissance. Ces formes amastigotes continuent à se multiplier jusqu'à entrer, au septième jour, en phase de lyse parasitaire. La concentration obtenue des formes amastigotes récemment transformées de formes promastigotes en phase stationnaire de croissance ( $3,5 \cdot 10^7/\text{ml}$ ) est supérieure à celle obtenue précédemment ( $2,5 \cdot 10^7/\text{ml}$ ). Cependant l'inoculum de départ est de deux fois supérieur à celui utilisé pour la cinétique de croissance.

## **2. Etude des profils polypeptidiques totaux des formes promastigotes et amastigotes de *L. amazonensis* et de leurs produits d'excrétion-sécrétion**

Un premier travail a consisté à analyser les profils polypeptidiques totaux (PPT) des lysats parasitaires des deux stades parasitaires de *L. amazonensis* récoltés en début de phase stationnaire de leur croissance. L'extraction au Triton X114 des culots parasitaires correspondant a ensuite permis de déterminer la répartition de ces protéines en fonction de leur propriété de solubilité dans ce détergent. Enfin, une attention plus particulière a été portée sur la mise en évidence des protéines excrétées-sécrétées au cours de la croissance et de la maturation des deux stades parasitaires.

### **2.1. Choix des conditions d'analyse**

La révélation des PPT obtenus en SDS-PAGE a été réalisée par la coloration au nitrate d'argent dont le seuil de sensibilité de 2 ng (équivalent protéine) est nettement supérieur à celui de la coloration au bleu de Coomassie (0,3  $\mu\text{g}$ ). Il faut noter que le nitrate d'argent révèle préférentiellement des protéines riches en acides aminés soufrés (méthionine, cystéine) contrairement au bleu de Coomassie qui se fixe principalement aux résidus d'acides aminés basiques (lysine, arginine, histidine).

L'analyse des PPT en condition réductrice, par rapport à celle en condition non réductrice, permet une meilleure séparation et résolution des protéines et rend leur interprétation plus aisée. En effet, la réduction consiste en l'addition d'un agent réducteur puissant dans le tampon échantillon, le  $\beta$ -mercaptoéthanol, qui clive les ponts disulfures des cystines (deux résidus cystéines reliés par un pont disulfure). Le traitement à 100°C de l'échantillon pendant 3 min rend total ces clivages. Les structures tertiaires et quaternaires des protéines sont ainsi altérées. La protéine est alors complètement dépolymérisée et linéarisée. Après avoir comparé les deux conditions, notre choix s'est donc porté sur l'analyse d'échantillons réduits.

### **2.2. Comparaison des profils polypeptidiques parasitaires des formes promastigotes et amastigotes de phase stationnaire en condition réductrice**

La comparaison des profils parasitaires a porté d'une part, sur des extraits polypeptidiques totaux (EPT) préparés classiquement en présence de Triton X100 (TX100) et d'autre part, sur ceux obtenus après séparation de phase au Triton X114 (TX114). Cette étude qui privilégie une analyse qualitative a été réalisée en déposant dans les puits des gels 5 $\mu\text{g}$  équivalent protéine de chaque extrait polypeptidique.

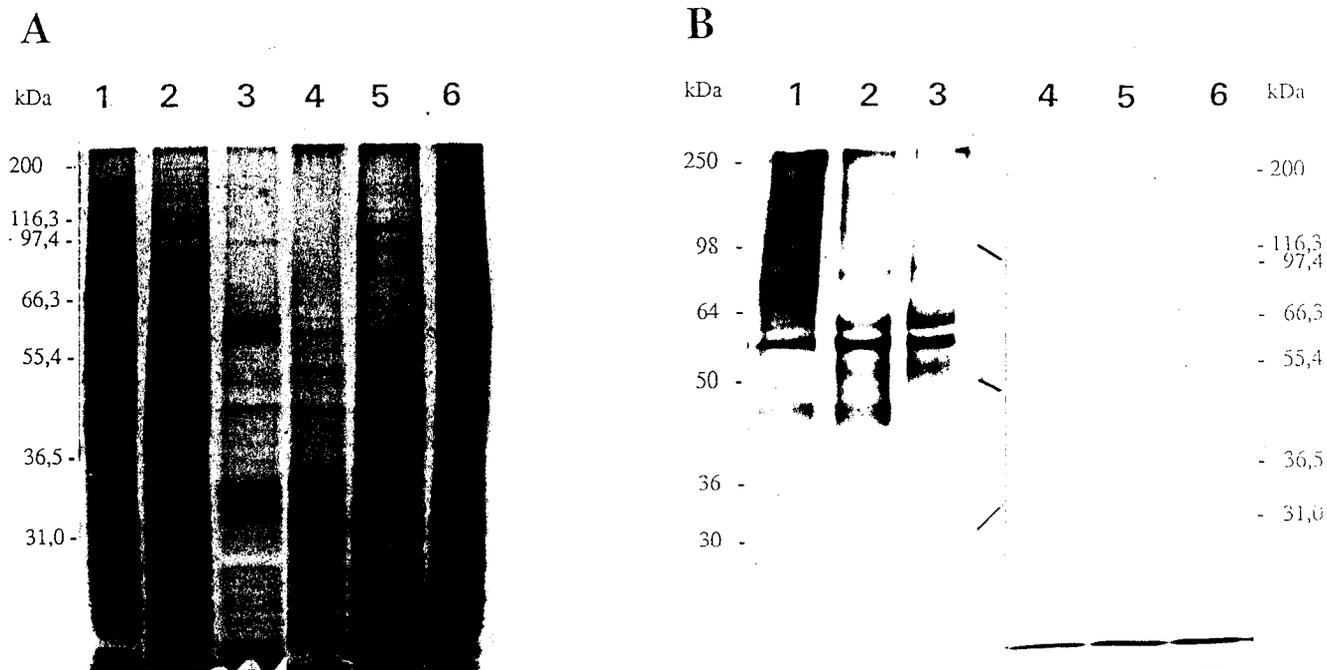


Figure 6 : Profils polypeptidiques de lysats parasites et des produits d'excrétion-sécrétion des formes promastigotes et des formes amastigotes de *L. amazonensis* obtenus en gel de polyacrylamide SDS-PAGE, en condition réductrice.

A : Profil polypeptidique de parasites en phase stationnaire (J7) : extraits totaux de promastigotes (1) et, après extraction au Triton X114, de la phase aqueuse de promastigote (2) et de la phase détergente correspondante (3), de la phase détergente d'amastigotes (4) et de la phase aqueuse correspondante (5) et d'extraits totaux d'amastigotes (6).

B : Cinétique des produits d'excrétion-sécrétion d'une culture continue de promastigotes (1, 2 et 3) ou d'amastigotes (4, 5, et 6) en début (1, 4), en cours de phase exponentielle (2 et 5) et en phase stationnaire (3 et 6).

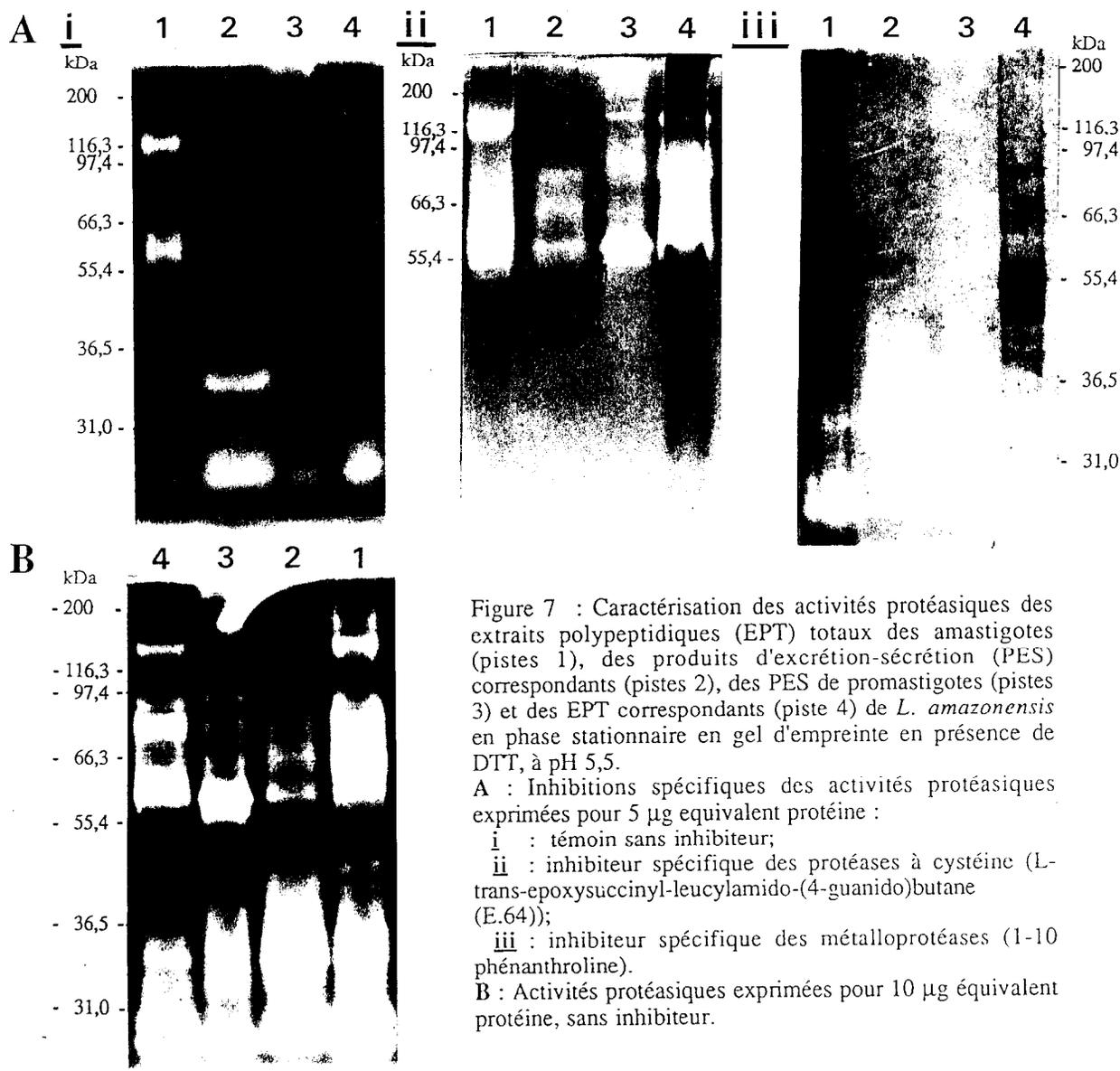


Figure 7 : Caractérisation des activités protéasiques des extraits polypeptidiques (EPT) totaux des amastigotes (pistes 1), des produits d'excrétion-sécrétion (PES) correspondants (pistes 2), des PES de promastigotes (pistes 3) et des EPT correspondants (piste 4) de *L. amazonensis* en phase stationnaire en gel d'empreinte en présence de DTT, à pH 5,5.

A : Inhibitions spécifiques des activités protéasiques exprimées pour 5 µg équivalent protéine :

- i : témoin sans inhibiteur;
- ii : inhibiteur spécifique des protéases à cystéine (L-trans-époxy succinyl-leucylamido-(4-guanido)butane (E.64));
- iii : inhibiteur spécifique des métalloprotéases (1-10 phénanthroline).

B : Activités protéasiques exprimées pour 10 µg équivalent protéine, sans inhibiteur.

### 2.2.1. Analyse des EPT

Comme le montre la figure 6,A , les PPT des lysats parasitaires des formes promastigotes (profil 1) et amastigotes (profils 6) sont très complexes mettant en évidence environ une quarantaine de protéines de poids moléculaires apparents allant de 10 à 200 kDa. Ils présentent entre eux des analogies, avec plusieurs protéines majeures communes aux deux stades de 85, 44, 42, 40, 27 et environ 23 kDa. Les PPT révèlent, outre des différences quantitatives, des différences qualitatives mettant ainsi en évidence des protéines spécifiques soit du stade amastigote (protéine de 35 kDa) soit du stade promastigote (protéines de 116, 65, 37 et environ 22 kDa).

### 2.2.2. Analyse des extraits obtenus après séparation de phase

Le TX114 est un détergent qui permet de séparer des molécules selon leurs propriétés physico-chimiques de solubilité dans celui-ci. Par séparation de phases, sont ainsi dissociées les protéines amphiphiles, c'est à dire à la fois hydrophiles et lipophiles, des protéines hydrophiles solubles en phase aqueuse, tout en conservant les structures natives et les activités enzymatiques de ces protéines. Les protéines membranaires sont généralement des protéines amphiphiles possédant un ancrage lipidique.

Cette étude a été réalisée en déposant dans les puits de gels 5 µg équivalent protéine de phase aqueuse. L'interférence du TX114 dans les dosages de protéines n'a pas permis de déterminer la concentration protéique de la phase détergente. Cinq microgrammes ont donc été estimés en tenant compte des rapports volumiques des deux phases, connaissant la concentration protéique de la phase aqueuse. Comme le montre la figure 6,A, les phases TX114 (pistes 3 et 4) présentent des profils polypeptidiques beaucoup plus simples que ceux de phases aqueuses (piste 2 et 5), ces derniers présentant une plus grande homologies avec ceux des EPT (piste 1 et 6). Il est intéressant de noter que la phase détergente des promastigotes concentre des protéines d'environ 62, 57, 45, 34, 33, 32 kDa dont celle de 62 kDa semble spécifique de ce stade parasitaire et celle de 32 kDa est fortement concentrée chez les formes amastigotes. Cette dernière représente l'une des protéines majeures de ce stade parasitaire.

### **2.3 Analyse des protéines naturellement excrétées-sécrétées au cours des cinétiques de culture des deux stades parasitaires**

Les surnageants de milieu de culture métabolisés par les parasites sont peu concentrés en protéines et n'ont pu être dosés. Ce dosage, qui a donc été réalisé sur des surnageants concentrés par rapport à un milieu de culture neuf préparé dans les mêmes conditions, n'a pas donné de résultat reproductible. C'est surtout l'interférence de la coloration du surnageant concentré avec le dosage colorimétrique utilisé qui n'a pas permis de déterminer précisément les quantités de protéines excrétées-sécrétées par les parasites. De façon empirique et connaissant la sensibilité de la coloration au nitrate d'argent, la concentration protéique de ces surnageant est de l'ordre du microgramme. Les surnageants des milieux de culture ont donc été concentrés de façon à déposer des quantités de PES équivalentes à environ  $3 \cdot 10^6$  parasites (qui correspondent à environ 5 µg équivalent protéines d'EPT).

Nous montrons pour la première fois grâce au modèle expérimental utilisé, la présence de protéines excrétées-sécrétées aussi bien par les formes promastigotes que par les formes amastigotes de *L. amazonensis* (figure 6,B, piste 3 et 6), le témoin de culture concentré 200 fois ne révélant aucune protéine.

D'une manière générale, les profils polypeptidiques des PES s'avèrent beaucoup plus simples que ceux des lysats parasitaires correspondants. Une quinzaine de protéine est observable pour chaque stade parasitaire. Les PES des formes promastigotes sont quantitativement plus riches en protéines que ceux des amastigotes comme l'indique l'intensité des bandes révélées (figure 6,B). Les promastigotes présentent une protéine majeure d'environ 57 kDa dont l'intensité fluctue en fonction des différentes phases de leur croissance pour être maximale en fin de phase exponentielle (piste 1 à 3). Deux protéines de 85 et 62 kDa semblent spécifiques du stade promastigote. La première fortement excrétée en début de phase exponentielle (piste 1) diminue d'intensité au cours de la cinétique, tout comme celle de 40 kDa ou celles d'environ 135, 180 et 200 kDa. La deuxième protéine (62 kDa) s'accumule dans les surnageants pour être maximale en phase stationnaire de la culture (piste 3), comme la protéine de 51 kDa ou celles de poids moléculaire inférieur à 40 kDa qui présentent des signaux plus diffus. Un polypeptide de 53 kDa n'est présent qu'en phase exponentielle et d'autres telle que la protéine de 65 kDa ne sont révélées qu'en phase stationnaire de la croissance des formes promastigotes.

Les profils polypeptidiques des formes amastigotes sont plus diffus. Une protéine majeure de 55 kDa est présente à tous les stades de leur croissance. D'autres sont révélées, soit avec une intensité croissante (à environ 75 et 63 kDa) ou décroissante (49 kDa) au cours de la cinétique, soit plus spécifiquement en phase stationnaire (principalement celles d'environ 27 et 25 kDa).

Une protéine d'environ 44 kDa semble commune aux deux stades mais est principalement présente en début de phase exponentielle chez les promastigotes et plutôt en phase stationnaire chez les amastigotes.

### **3. Expression et caractérisation des activités protéasiques parasitaires totales et excrétées-sécrétées**

Dans un premier temps, l'étude a porté sur la mise en évidence et la caractérisation des activités protéasiques identifiées dans les lysats parasitaires de phase stationnaire de la culture et les produits d'excrétion-sécrétion correspondant des formes promastigotes et amastigotes de *L. amazonensis*. Leur répartition après extraction au TX114 et leur condition d'expression ont été analysées. Enfin, leur expression au cours de différentes séquences du cycle de développement parasitaire *in vitro* a été étudiée.

Les activités protéasiques ont été étudiées à température ambiante à pH 5,5 en présence de dithiothréitol (DTT) qui rompt les ponts disulfures, stabilisant certaines activités protéasiques et notamment celles de la famille des cystéine-protéases. En effet, d'après des travaux récents réalisés au laboratoire sur les lysats parasitaires et ceux présentés à la figure 8, ces conditions expérimentales sont optimales pour observer les principales activités exprimées par les divers échantillons étudiés. Le pH acide et le milieu réducteur sont représentatifs, des conditions rencontrées par le stade amastigote dans le phagolysosome des macrophages infectés. La température ambiante mime les conditions de

températures rencontrées par le stade promastigote chez l'insecte vecteur. La standardisation des conditions expérimentales (température, pH et milieu réducteur) rendent possible une analyse comparative des différentes protéases exprimées.

Comme pour l'étude précédente, des quantités équivalentes de protéines (5 ou 10 µg) d'EPT et des volumes de surnageants concentrés correspondants à  $3 \times 10^6$  parasites sont déposés dans les puits des gels d'empreinte. Cette étude privilégie donc l'analyse des activités spécifiques.

### **3.1. Expression et identification des activités protéasiques cellulaires et excrétées-sécrétées par les parasites de phase stationnaire**

Pour les lysats aux TX100, 10 µg ont été déposés ce qui rapporte donc ces extraits à un même nombre de parasites que pour les PES. Les quantités déposées pour les PES sont les mêmes que celles déposées pour les profils polypeptidiques.

La figure 7 représente les activités protéasiques exprimées par les parasites de phase stationnaire, et contenues dans leurs surnageants concentrés correspondants, et ceci à deux concentrations, 5 µg (figure 7,A,i) et 10 µg (figure 7,B). Les résultats, de la figure 7 A, représentent respectivement l'inhibition spécifique des activités cystéines protéases par le L-trans-époxy succinyl-leucylamido-(4-guanido)butane (=E64) (figure 7,A,ii) et celle des métalloprotéases en présence de la 1-10 phénanthroline (figure 7,A,iii), qui inhibe notamment spécifiquement l'activité métalloprotéasique de la gp63.

L'étude comparée des profils protéasiques obtenus en gels d'empreinte incubés ou non avec les inhibiteurs décrits précédemment (figure 7,A) nous permet d'identifier principalement trois catégories d'activités protéasiques : deux familles classiquement décrites chez les leishmanies, les protéases à cystéine de bas poids moléculaire (inférieur à 50 kDa) et les métalloprotéases exprimées dans une large zone de plus hauts poids moléculaires (de 50 à 200 kDa), et enfin, une protéase de haut poids moléculaire (environ 250 kDa) non identifiée qui n'est inhibée ni par les inhibiteurs spécifiques utilisés, ni par les inhibiteurs de serine protéase (résultat non présenté). Cette dernière présente de plus la particularité de n'être révélée que par les PES des formes promastigotes (figure 7,B, piste 2).

D'une manière générale, les deux stades parasitaires présentent des différences majeures tant quantitatives que qualitatives dans l'expression de leurs activités protéasiques, comme cela a déjà été mis en évidence par différents travaux réalisés sur la forme amastigote intracellulaire d'espèces appartenant au même complexe que *L. amazonensis*. 64). L'analyse des surnageants concentrés, rendue possible grâce à l'approche utilisée, démontre de façon évidente la présence d'activités protéasiques dans les PES des deux stades parasitaires de *L. amazonensis*.

Deux doublets de cystéine-protéases majeures sont principalement révélés chez les EPT du stade amastigote (figure 7,B, piste 1). Le premier doublet (34-35 kDa) et notamment, la protéase de 35 kDa est plus spécifique de ce stade contrairement au second (27-25 kDa). Ces activités cystéines protéases sont principalement excrétées-sécrétées par les formes amastigotes (figure 7,B, piste 2). Enfin, une autre cystéine protéase d'un poids moléculaire apparent de 43 kDa, de plus faible activité, n'est révélée que dans les EPT de ce stade.

Les activités métalloprotéasiques semblent plus variées et sont exprimées par les deux stades parasitaires. Certaines sont communes aux deux stades (140, 90 et 80 kDa), d'autres sont spécifiques soit de la forme amastigote (170 kDa et environ 78 à 63 kDa), soit de la forme promastigote (zone de 62 à 60 kDa). Contrairement au stade amastigote, les formes promastigotes excrètent-sécrètent principalement deux métalloprotéases ayant des poids moléculaires apparents respectifs d'environ 60 et 56 kDa dont la mobilité électrophorétique est légèrement supérieure à l'activité métalloprotéasique majeure du stade promastigote d'environ 62 kDa (figure 7,B, piste 3). La métalloprotéase de 140 kDa, présente dans les EPT des deux formes parasitaires, est absente de leurs PES, alors que la protéase non identifiée de 250 kDa révélée uniquement dans les PES de promastigotes, ne s'exprime pas dans les deux EPT.

### **3.2. Étude de la compartimentation des activités protéasiques et de leurs conditions d'expression**

L'analyse des activités protéasiques des phases détergentes et aqueuses, obtenues après extraction au TX114 de culots parasitaires de formes promastigotes et amastigotes, rend compte du caractère amphiphile ou hydrophile des protéases dont l'expression a été étudiée dans différentes conditions de pH et en présence ou non d'un agent réducteur.

Le but de cette étude est d'identifier la répartition des protéases des EPT de phase stationnaire, dont certaines pourraient être préférentiellement de nature membranaire contrairement à d'autres solubles en phase aqueuses, donc plutôt hyaloplasmique.

Cinq microgrammes équivalent protéine d'extraits parasitaires ont été déposés sur les gels .

#### **3.2.1. Expression d'activités protéasiques en fonction de facteurs physico-chimiques liés à l'environnement des parasites**

La figure 8 nous représente les quatre conditions dans lesquelles les gels d'empreintes ont été incubés. Deux conditions de pH ont été utilisées, soit un pH 7,2 (A et C), soit un pH 5,5 (B et C), en l'absence (A et B) ou en présence de DTT (C et D).

Dans l'ensemble, les activités métalloprotéasiques s'expriment de la même façon dans les quatre conditions étudiées. Néanmoins, une métalloprotéase de 90 kDa, spécifique de la phase détergente des promastigotes, semble être activée à pH acide. De plus, dans ces conditions de pH celle-ci s'exprime avec plus d'intensité en milieu réducteur (présence de DTT).

A pH neutre, en l'absence de DTT aucune des activités cystéine-protéases précédemment décrites n'est révélée (figure 8, A). Certaines d'entre elles, notamment le doublet de 27-25 kDa des phases aqueuses des deux stades parasitaires, commencent à s'activer à pH acide en condition non réductrice (figure 8, B). L'expression des activités cystéines protéases semble aussi très dépendante des conditions réductrices. Ainsi à pH 7,2, les deux doublets de cystéine-protéase et plus particulièrement leurs bandes de plus faible poids moléculaire (34 et 23 kDa) apparaissent uniquement en condition réductrice (figure 8, C). Il en est de même pour la cystéine protéase de 43 kDa spécifique des EPT des formes amastigotes. Enfin l'ensemble des cystéines-protéases révèlent leurs plus fortes activités à pH acide en présence de DTT (figure 8, D). L'expression des cystéine-protéases,

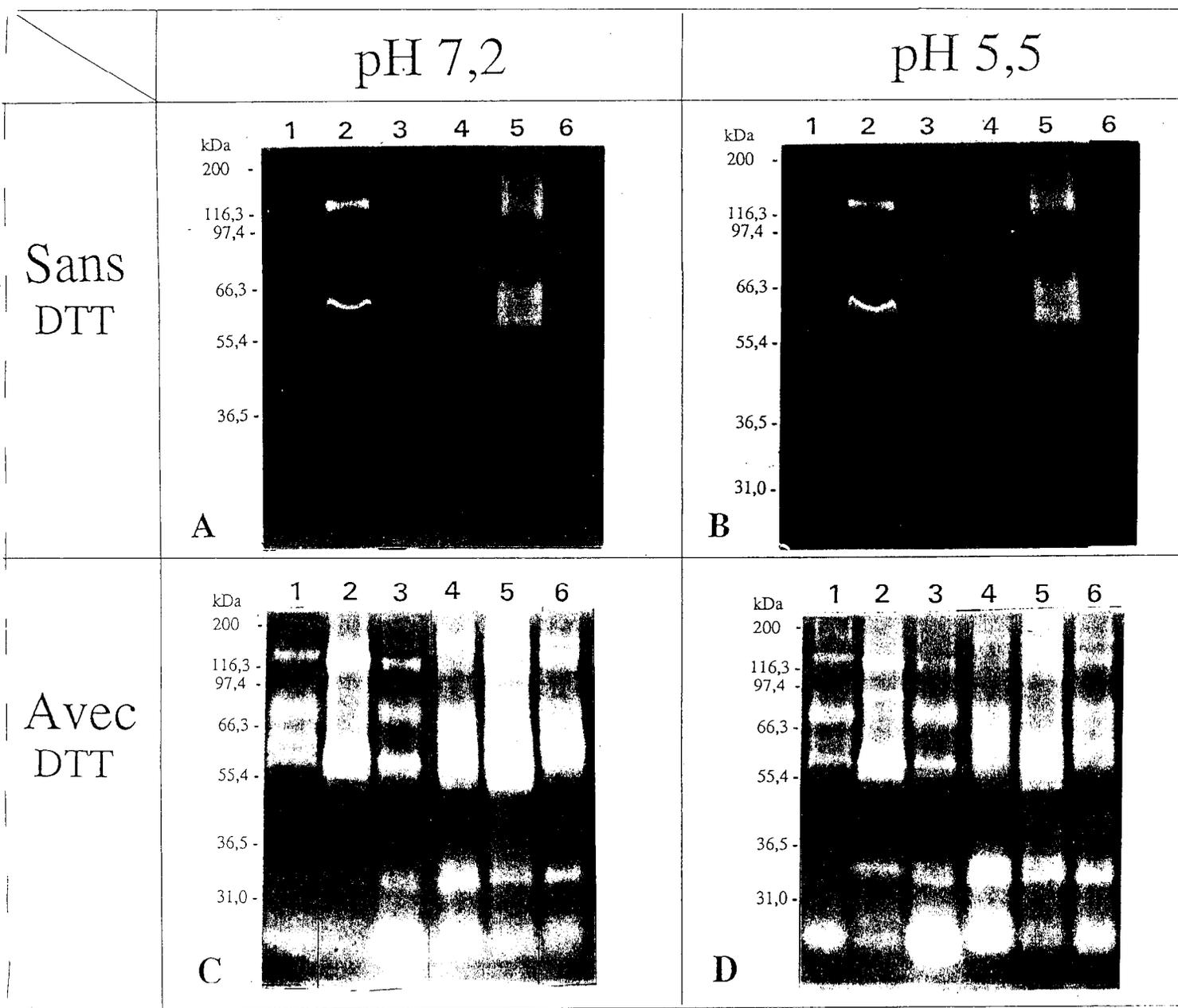


Figure 8 : Analyse de la compartimentation des activités protéasiques et de leurs conditions d'expression, en gel d'empreinte, des promastigotes (pistes 1, 2 et 3) et des amastigotes (pistes 4, 5 et 6) de *L. amazonensis* en phase stationnaire selon deux conditions de pH, en milieu réducteur (avec 0,5 mM de DTT) ou non.

Extraits polypeptidiques totaux de promastigotes (piste 1), phase Triton X114 de culots de promastigotes (piste 2) et phase aqueuse correspondante (piste 3), phase aqueuse des culots d'amastigotes après extraction au TX114 (piste 4), phase TX114 correspondante (piste 5), et EPT du stade amastigote (piste 6).

contrairement aux métalloprotéases, est donc dépendante à la fois du pH et du caractère réducteur du milieu environnant.

### 3.2.2. Compartimentation cellulaire des protéases

L'analyse de la répartition des protéases après extraction au TX114 concerne les profils protéasiques obtenus à pH acide en condition réductrice (figure 8, D).

La phase TX114 des promastigotes concentre deux activités métalloprotéasiques majeures de 140 et 62 kDa (piste 2). La première s'exprime faiblement dans la phase aqueuse correspondante contrairement à la deuxième qui y semble absente (piste 3). Cette dernière présente une empreinte déformée caractéristique qui pourrait être en relation avec sa forte concentration ou ses caractéristiques biochimiques particulières. D'autres métalloprotéases sont présentes dans la phase détergente (90, 80 et un complexe de 61 à 57 kDa). La métalloprotéase de 90 kDa révélée uniquement dans la phase détergente, n'est pas visible sur le profil protéasique des EPT des formes promastigotes alors que d'autres métalloprotéases sont retrouvées dans ce profil (piste 1). La métalloprotéase de 80 kDa, commune aux deux stades parasitaires, est plutôt concentrée en phase aqueuse. Le complexe d'environ 61 à 57 kDa s'exprime plus faiblement dans la phase aqueuse.

Le doublet cystéine protéase de 27-25 kDa se retrouve préférentiellement exprimé dans la phase aqueuse des formes promastigotes. Des activités cystéine-protéases (35-34 kDa) non observables sur le profil protéasique des EPT apparaissent au niveau des deux phases.

Les différentes métalloprotéases des amastigotes, plus complexes et diffuses, ne présentent pas une séparation de phases aussi nette que celle des formes promastigotes. Cependant, la phase détergente, où la métalloprotéase de 62 kDa des promastigotes ne semble pas s'exprimer, concentre plutôt un triplet de plus faible poids moléculaire (60 kDa et environ 57 et 54 kDa) dont celle de 54 kDa, semble spécifique de ce stade amastigote. Des activités de plus haut poids moléculaire (170, 140 et 65 kDa) sont aussi concentrées dans cette phase détergente. Les activités métalloprotéasiques d'environ 70 et 80 kDa, présentent dans l'EPT, se révèlent plutôt dans la phase aqueuse.

Les deux doublets de 35-34 et 27-25 kDa expriment une forte activité cystéine protéase en phase aqueuse, comme cela a été observé précédemment chez la forme promastigote pour le doublet de 27-25 kDa. L'activité du premier doublet, bien qu'elle se répartisse dans les deux phases, semble s'exprimer surtout dans la phase aqueuse. Cette répartition préférentielle dans la phase aqueuse est encore plus nette pour le premier doublet. Enfin, la protéase à cystéine d'environ 43 kDa spécifiquement exprimée dans l'EPT du stade amastigote est peu représentée dans l'une ou l'autre phase.

Au total, les activités cystéine-protéases, semblent acquérir des propriétés de plus en plus hydrophiles en fonction de l'augmentation de leur mobilité électrophorétique.

### **3.3. Étude de l'expression des protéases lors des principales séquences du cycle de développement parasitaire *in vitro* de *L. amazonensis***

Cinq microgrammes équivalent protéine ont été déposés dans les différents puits des gels.

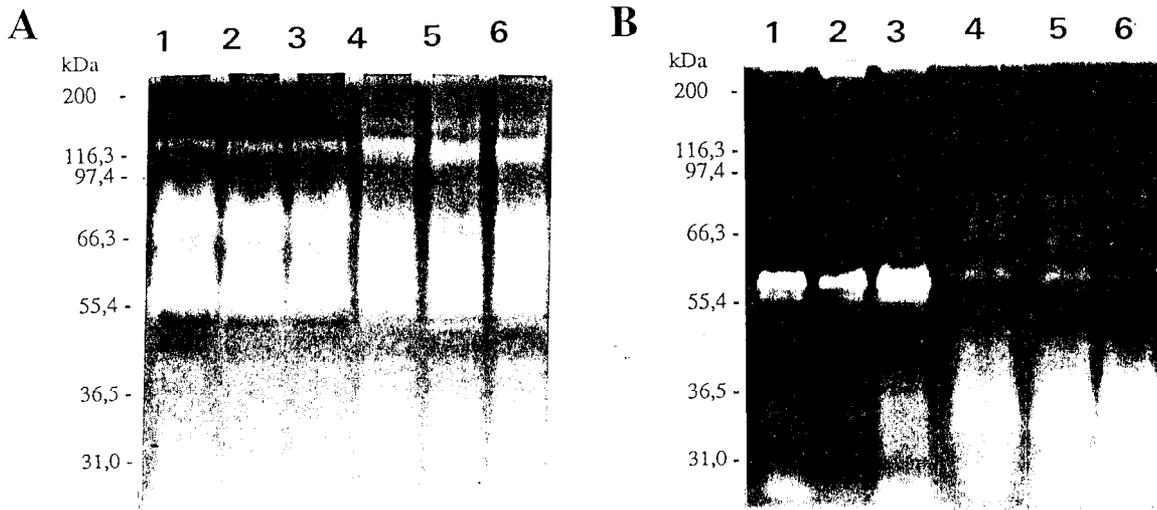


Figure 9 : Activités protéasiques exprimées par les extraits parasitaires totaux (A) ou par les produits d'excrétion-sécrétion correspondants (B) lors d'une cinétique de culture *in vitro* des formes promastigotes (pistes 1,2 et 3) et amastigotes (pistes 5, 6 et 7) de *L. amazonensis* en gel d'empreinte (pour 5  $\mu$  équivalent protéine).  
Cinétique au jour 3 (J3, piste 1), J5 (piste 2), J7 (piste 3) d'une culture de promastigotes et à J3 (piste 4), J5 (piste 5) et J7 (piste 6) d'une culture d'amastigotes.

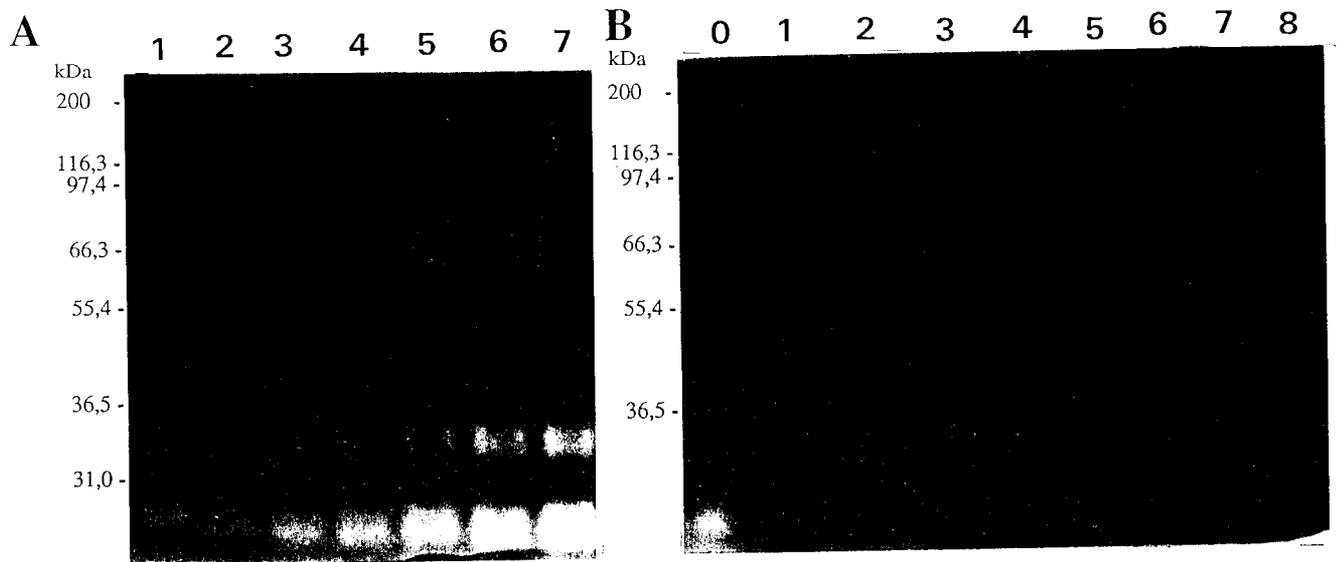


Figure 10 : Activités protéasiques exprimées par les extraits parasitaires totaux (A) ou par les produits d'excrétion-sécrétion correspondants (B) lors d'une cinétique de différenciation *in vitro* des formes promastigotes en formes amastigotes de *L. amazonensis* en gel d'empreinte (pour 5  $\mu$  équivalent protéine).  
Pproduits d'excrétion-sécrétion (PES) de promastigotes en phase stationnaire, lors de leur cinétique de croissance (piste 0); extraits polypeptidiques totaux et PES aux jours 1 (J1, piste 1), à J2 (piste 2), J3 (piste 3), J4 (piste 4), J5 (piste 5), J6 (piste 6), J7 (piste 7) lors de la différenciation des promastigotes en formes amastigotes; PES d'amastigotes en phase stationnaire lors de leur cinétique de croissance (piste 8).

### 3.3.1. Activités protéasiques exprimées par les formes promastigotes et amastigotes au cours de leur culture *in vitro*

Chez les formes promastigotes et amastigotes, trois points de cinétique ont été analysés : le début de la phase exponentielle (troisième jour, J3) (piste 4), la phase exponentielle (J5) et la phase stationnaire (septième jour, J7) (piste 6) (voir figures 9 et 10).

#### 3.3.1.1. Analyse des lysats parasitaires totaux

La figure 9, A représente la migration en gel d'empreinte d'extraits peptidiques totaux de lysat de culots parasitaires récoltés aux différents jours de la culture des promastigotes (piste 1, 2 et 3) et des amastigotes (piste 4, 5 et 6).

Différentes protéases, caractérisées précédemment, présentent des expressions différentielles au cours des différentes étapes de la croissance des deux stades parasitaires.

Chez les promastigotes, les différentes activités protéasiques s'exprime dès le début de la phase exponentielle sans présenter, au cours de leur cinétique, de variation majeure dans leur intensité. Les métalloprotéases de 62, 60 et 56 kDa semblent posséder une activité protéasique un peu plus importante en phase exponentielle (piste 2). Le doublet d'activité cystéine protéase de 27-25 kDa ou les métalloprotéases de 140 et 80 kDa possèdent une même empreinte gelatino-lytique au cours de la croissance du stade promastigote.

Chez l'amastigote, l'expression des activités cystéine-protéases (43, 35-34 et 27-25 kDa) augmente pour être maximale en phase stationnaire (piste 6). Parmi celles-ci, la cystéine protéase de 34 kDa présente une activité plus intense au cours de la croissance de ce stade parasitaire.

La famille des métalloprotéases de la forme intracellulaire s'exprime de façon plus complexe. La métalloprotéase de 140 kDa s'active lors de la croissance de ce stade parasitaire alors que celle de 170 kDa, spécifique du stade amastigote, s'exprime de façon constante. Deux autres métalloprotéases de 60 et environ 57 kDa ne présentent pas de variation dans l'expression de leur activité protéasique. Les trois métalloprotéases de poids moléculaire supérieur présentent une activité accrue, l'une de 65 kDa en phase exponentielle (piste 5) et les deux autres d'environ 80 et 70 kDa en phase stationnaire (piste 6). Finalement, la métalloprotéase de 54 kDa, spécifique du stade amastigote et à propriété amphiphile, qui semble être présente sous sa forme inactivée chez les formes promastigotes, semble ne s'activer qu'à partir de la fin de phase exponentielle (J5) chez l'amastigote (piste 6).

#### 3.3.1.2. Analyse des produits d'excrétion-sécrétion

Les profils protéasiques, révélés par gel d'empreinte, des produits excrétés-sécrétés par un même nombre de parasites au cours des différentes étapes de croissance des deux stades parasitaires sont présentés sur la figure 9, B.

Chez les promastigotes, dès le début de la phase exponentielle, les trois protéases majeures déjà étudiées précédemment, s'expriment. Les deux activités métalloprotéasiques de 60 et 56 kDa s'intensifient en phase stationnaire, alors que la protéase non identifiée d'environ 250 kDa possède une activité équivalente aux différents jours de la cinétique.

Chez les amastigotes, les activités cystéine-protéases augmentent dès la fin de phase exponentielle pour être maximale en phase stationnaire. Ceci est surtout observé pour les protéases à

cystéine du doublet de 27-25 kDa ainsi que celle de 34 kDa (empreinte inférieure du doublet de 35-34 kDa) qui présentent une forte activité en phase stationnaire (piste 6). Par contre, de faibles activités métalloprotéasiques sont exprimées de façon constante lors des différentes phases de la croissance du stade amastigote (pistes 4, 5 et 6).

### 3.3.2. Étude des activités protéasiques au cours de la différenciation de promastigotes en amastigotes

Grâce au modèle de culture *in vitro* développé au laboratoire, la modulation des activités protéasiques exprimées au cours de la différenciation de promastigotes en amastigotes a été étudiée. Le matériel parasitaire (EPT et PES) a été récolté tous les jours pendant une semaine après l'inoculation des promastigotes dans les conditions de culture des amastigotes (pistes 1 à 7).

#### 3.3.2.1. Analyse des EPT

Au cours de la différenciation des promastigotes en amastigotes, l'expression différentielle de trois groupes de protéases est mise en évidence (figure 10, A).

Un premier groupe concerne un doublet de protéases de 170-140 kDa. Ainsi, l'activité métalloprotéasique de 170 kDa augmente significativement pendant que celle de 140 kDa s'inactive progressivement au cours de la transformation. Leurs activités diffèrent des EPT d'amastigotes et de promastigotes de phases stationnaires précédemment étudiées, qui montraient surtout l'expression de la métalloprotéase de poids moléculaire inférieur (140 kDa).

Un complexe d'activités métalloprotéasiques de 90 à 60 kDa présente aussi de fortes variations au cours de cette séquence. L'activité du doublet de 90-80 kDa augmente lors de la différenciation, la métalloprotéase de plus haut poids s'activant au cinquième jour de la phase du processus de différenciation. Une métalloprotéase de 70 kDa se révèle à J3 et son activité est maximale à J5. Une autre métalloprotéase de 59 kDa, observable dès J1 (piste 1), semble présenter au cours de la cinétique de différenciation une diminution de sa mobilité électrophorétique (65 kDa à J7) accompagnée d'une activation de son activité protéasique. Enfin, deux activités métalloprotéasiques d'environ 57 et 54 kDa apparaissent en fin de la cinétique de différenciation (J6).

Finalement, les activités cystéine-protéases des deux doublets augmentent lors des différentes étapes de différenciation du stade promastigote en amastigote et lors de la croissance du stade amastigote. Le premier doublet (35-34 kDa) s'active plus tardivement (à J5, piste 5) que le deuxième doublet (27-25 kDa) qui présente une activité importante dès le début de la séquence (à J1, piste 1).

#### 3.3.2.2. Analyse des produits d'excrétion-sécrétion

L'analyse de la figure 10, B, représentant les activités protéasiques révélées par des PES au cours de la différenciation des formes promastigotes en formes amastigotes.

La métalloprotéase majeure des PES de promastigote de 60 kDa, dont l'intensité de l'activité protéasique augmente dans les PES au cours de la culture des promastigotes, perd progressivement son activité au cours des différentes étapes de la transformation des promastigotes en amastigotes. Au contraire, une activité cystéine-protéases d'environ 35 kDa apparaît au cinquième jour de différenciation pour être maximale dans les PES du septième jour de la cinétique. Son activité est

alors de la même intensité que celle observée dans les PES d'amastigotes de phase stationnaire de culture (piste 8).

## V. DISCUSSION

Le modèle de culture *in vitro* mis au point au laboratoire de Biologie parasitaire de l'ORSTOM nous a permis d'envisager cette étude. Les principales étapes du cycle de développement parasitaire de *L. amazonensis* ont ainsi été mimées *in vitro*, en milieu complètement défini. La culture *in vitro* des formes promastigotes reproduit les phases de prolifération et de maturation au cours de la métacyclogénèse chez l'insecte vecteur qui prépare les formes promastigotes à devenir infectieuses. La cinétique de différenciation des promastigotes en amastigotes correspond à la phase infectieuse où le parasite doit, à l'intérieur du macrophage, se transformer et s'adapter à l'hostilité de son nouvel environnement, et s'opposer à tous les moyens de défense mis en oeuvre par l'hôte. La culture *in vitro* des amastigotes mime les différentes étapes de développement parasitaire qui interviennent lorsque ceux-ci, après avoir été libérés dans le milieu extracellulaire, vont réinfester d'autres macrophages. Les formes amastigotes maintiennent en effet l'infection parasitaire des macrophages de leur hôte mammifère pendant de longues périodes, parfois plusieurs années.

Ce modèle de culture *in vitro* réalisé chez *L. amazonensis*, présente l'avantage de ne posséder aucun contaminant sérique ou cellulaire qui pourrait se concentrer dans les PES ou interférer avec les activités protéasiques. Aucun doute ne peut alors subsister quant à l'origine parasitaire des protéines et des protéases mises en évidence.

L'analyse des profils polypeptidiques des extraits parasitaires, assez complexe, a révélé la présence dans les lysats parasitaires d'environ une quarantaine de protéines, dont certaines sont spécifiques soit des formes promastigotes, soit des formes amastigotes. Peu de protéines amphiphiles ont été mises en évidence dans les phases détergentes obtenues après extraction au Triton X114, la majeure partie des protéines extraites possédant au contraire des propriétés hydrophiles.

Les deux familles de protéases classiquement rencontrées chez les protozoaires (11) ont été observées dans les extraits parasitaires totaux des formes promastigotes et amastigotes de *L. amazonensis*. Les activités métalloprotéasiques s'expriment indifféremment à pH acide ou à pH neutre, en milieu réducteur ou non, à l'exception d'une protéase de 90 kDa qui se révèle spécifiquement en condition réductrice et à pH acide chez le promastigote. La fonction de cette métalloprotéase reste à déterminer. Les formes promastigotes expriment une métalloprotéase majeure de 62 kDa, spécifique de ce stade, possédant une empreinte électrophorétique caractéristique. Cette métalloprotéase de part sa forte activité et son caractère amphiphile doit correspondre à la gp63 présente à la surface des promastigotes de la plupart des espèces de leishmanies (10). D'autres métalloprotéases, de poids moléculaires apparents allant de 54 à 80 kDa, sont caractéristiques du stade amastigote.

Lors de la différenciation de la forme promastigote en forme amastigote, une métalloprotéase de 59 kDa s'active et semble augmenter en poids moléculaire apparent pour atteindre celui de 65 kDa. Cette protéase de 65 kDa a été détectée lors de l'analyse des profils protéasiques de la cinétique de

culture des formes amastigotes comme ayant un poids moléculaire constant, dont l'activité s'intensifie en phase exponentielle. Une autre métalloprotéase intéressante d'environ 54 kDa, ayant elle aussi des propriétés amphiphiles marquées et qui semble présente sous sa forme inactivée chez les promastigotes, s'exprime de façon optimale en phase exponentielle de la croissance des formes amastigotes et semble s'activer lors de la différenciation des promastigotes en amastigotes. L'identification précise de ces différentes métalloprotéases présentes chez la forme amastigote, à l'aide d'anticorps spécifiquement dirigés contre celles-ci, pourrait peut-être éclaircir les différents travaux réalisés sur la gp63. Les métalloprotéases des formes amastigotes s'expriment dans une zone de poids moléculaire analogue à celle de la gp63 et certaines d'entre elles possèdent des propriétés amphiphiles. La forme déglycosylée de la gp63, par traitement à la tunicamycine des promastigotes de *L. amazonensis*, possède un poids moléculaire apparent de 54 kDa mais ne semble pas exprimer d'activité protéasique (22). Par contre une activité protéasique correspondant à une isoforme déglycosylée de la gp63 a pu être observée chez *L. major* (65). Nous pouvons ainsi supposer que la métalloprotéase observée de 54 kDa soit une forme déglycosylée de la gp63.

Un doublet de métalloprotéases de haut poids moléculaire de 170 et 140 kDa, amphiphiles, non décrites dans la littérature, présente aussi une modulation de son activité selon les phases de développement des deux stades parasitaires. Celles de bas poids moléculaire s'exprime intensément chez le promastigote et l'amastigote lors de leur culture *in vitro*, alors que l'expression de celle de haut poids moléculaire augmente lors de la différenciation des promastigotes en amastigotes. Une modulation de leur activité semble donc accompagner les étapes de développement parasitaire.

Comme les métalloprotéases, les protéases à cystéine sont présentes chez les deux stades parasitaires de *L. amazonensis*, mais contrairement à celles-ci, leur expression est dépendante du milieu réducteur et du pH acide. Cette expression est prépondérante et plus diversifiée chez la forme amastigote que chez la forme promastigote. Ces résultats concordent avec les connaissances actuelles sur cette famille de protéases, et avec leur localisation dans des mégasomes chez le complexe *L. mexicana*, dont fait partie *L. amazonensis* (4). Ce compartiment cellulaire est en effet un milieu réducteur et acide où sont exprimées ces enzymes (4,6,31,64). L'expression des activités cystéine-protéases est associée avec le processus de prolifération du stade amastigote et de différenciation des promastigotes en amastigotes (64). Ce résultat important accroît l'intérêt que l'on peut porter à cette famille de protéases chez le stade médicalement important, celles-ci pouvant être impliquées dans la virulence de ces parasites (32). D'autre part, il est observé par séparation de phases, et d'après la littérature concernant ces enzymes, un phénomène qui pourrait être corrélé au processing de ces enzymes. Les différentes cystéine-protéases des amastigotes semblent acquérir des propriétés de plus en plus hydrophiles en relation avec l'augmentation de leur mobilité électrophorétique.

Ainsi, celle de poids moléculaire de 43 kDa, spécifique du stade amastigote et qui n'est pas toujours observée en gel d'empreinte, pourrait être un précurseur des enzymes de poids moléculaire inférieur (doublets de 35-34 et 27-25 kDa) qui au cours de leur clivage présenteraient des propriétés de plus en plus hydrophiles (31).

La possibilité de concentrer le surnageant de culture métabolisé par les parasites nous a permis pour la première fois de révéler la présence de protéines et de protéases excrétées-sécrétées par les

deux stades parasitaires au cours de leur développement . Dans nos conditions expérimentales, nous avons pu révéler la présence d'une quinzaine de protéines excrétées-sécrétées par les deux stades parasitaires. Les PES des promastigotes se sont avérés plus riches en protéines que ceux des formes amastigotes. Une expression différentielle de ces protéines au cours de la cinétique de croissance de chaque stade parasitaire a pu être observée. Ainsi, une protéine de 62 kDa chez les promastigotes ainsi que deux protéines de 27 et 25 kDa chez les amastigotes s'accumulent respectivement au cours de la culture de chaque stade parasitaire.

Les deux familles enzymatiques précédemment décrites au niveau des extraits parasitaires sont présentes dans les PES des deux stades parasitaires de *L. amazonensis*. Deux métalloprotéases majeures sont sécrétées par les promastigotes et les deux doublets de cystéine-protéases sont sécrétés avec de fortes activités par les amastigotes dans les milieux de culture. Durant la cinétique de culture, l'activation de l'empreinte gélatino-lytique de la métalloprotéase majeure de surface des promastigotes de 62 kDa est corrélée à celle de 60 kDa observée dans les PES correspondants. Il peut être envisagé que cette protéase de 60 kDa représente une forme soluble de la protéase majeure de surface des promastigotes. Ceci reste à démontrer.

Les PES de promastigotes possèdent de plus une activité protéasique unique, non identifiée, d'environ 250 kDa. Cette protéase n'a pas été observée dans les extraits polypeptidiques totaux de promastigotes ou après leur extraction au TX114. Son activité protéasique ne varie pas lors des différentes étapes de développement du promastigote contrairement aux autres activités majeures métalloprotéasiques. Ces activités métalloprotéasiques disparaissent lors de la différenciation de ce stade en amastigote. Par contre la surexpression des cystéines protéases s'accompagne de la prolifération du stade amastigote ainsi que la transformation du promastigote en amastigote.

Les protéases excrétées-sécrétées sont de plus corrélées aux activités spécifiques majeures exprimées par les EPT de chaque stade parasitaire. En effet, ces protéases, pour être sécrétées, doivent être synthétisées et libérées par les parasites. Les amastigotes pourraient, en effet, comme cela l'a déjà été supposé par Duboise *et al* (31), être sécrétées via le mégasome et la poche flagellaire et solubilisées à partir de la forme membranaire. Chez les promastigotes, les métalloprotéases pourraient être clivées et solubilisées à partir de la forme membranaire.

Mais une autre hypothèse peut être envisagée, à savoir la présence de ces protéines et de ces protéases par concentration de produits de lyse parasitaire. En effet, lors de culture ou de la différenciation, un certain nombre d'organismes se lysent (phénomène naturel). Des tests de viabilité à l'aide de colorants vitaux, tel que l'érythrosine B, réalisés au laboratoire ont montré que la lyse parasitaire, maximale en phase stationnaire (de 3 à 5 %) était d'environ 1 % lors des autres phases de la croissance parasitaire. Ainsi, si l'on envisage environ 4 % de lyse parasitaire en phase stationnaire, sachant que les surnageants sont concentrés au moins 200 fois, la concentration en protéines devrait être 8 fois plus importante dans les PES que dans les extraits polypeptidiques totaux correspondants. Or, les PES de phase stationnaire que nous avons étudiés sont constitués d'une fraction polypeptidique moins riche et plus simple que celle des EPT. Une quinzaine de protéines seulement sont observables par révélation au nitrate d'argent. D'autres arguments sont en faveur de l'excrétion-sécrétion de protéines et de protéases. Ainsi, l'activité protéasique d'environ 250 kDa des

promastigotes n'est pas présente chez les extraits polypeptidiques totaux correspondants. Le doublet de 27-25 kDa à activité cystéine-protéase des promastigotes n'est pas fortement excrété comme peuvent l'être ceux de même poids moléculaire ou de poids supérieur chez les amastigotes. De même, les activités métalloprotéasiques des amastigotes, amphiphiles ou hydrophiles, ne sont pas ou peu présentes dans les PES. Or en phase stationnaire une concentration d'un facteur 8 des produits de lyse les aurait révélés.

Notre étude, dans les conditions expérimentales utilisées, favorise donc l'hypothèse d'une excrétion-sécrétion naturelle par les formes promastigotes et les formes amastigotes de *L. amazonensis*.

Connaissant l'importance des rôles attribués aux protéases constitutives du parasite principalement au niveau du stade promastigote et plus récemment chez l'amastigote, la mise en évidence de protéases excrétées-sécrétées par ces parasites est donc fondamentale.

Les activités protéasiques des leishmanies possèdent ou possèderaient diverses fonctions cellulaires, qui pourraient donc être assurées par les facteurs d'excrétion-sécrétion : nutrition du parasite par dégradation des protéines en acides aminés métabolisés par le parasite, survie intracellulaire pour l'amastigote en dégradant des enzymes lysosomales de l'hôte, inactivation du choc oxydatif, régulation du cycle de développement parasitaire, évasion ou modulation de la réponse immune ou même dégradation de la matrice extracellulaire... (3) Cette dernière fonction a déjà été envisagée pour les protéases à cystéine des amastigotes au niveau des lésions cutanées (6), notamment observées pour tout le complexe *mexicana* où une concentration en macrophages et donc en parasites est observée. En effet cette famille de protéases chez les leishmanies est apparentée à la famille des cathepsines des mammifères. Or lors de l'invasion par des cellules tumorales la sécrétion de cathepsine D a été mise en évidence (62). Ces enzymes ont la capacité *in vitro* de dégrader la matrice extracellulaire et de déclencher des cascades de protéolyses et qui seraient impliquées *in vivo* dans la formation de métastases. La présence de ces cystéines-protéases sécrétées par certaines espèces de leishmanies pourraient donc être un facteur de pathogénicité chez l'hôte.

## CONCLUSION

En conclusion, l'étude réalisée *in vitro* a permis de mettre en évidence des produits d'excrétions-sécrétions produits par les formes promastigotes et les formes amastigotes de *L. amazonensis*, dont des protéases qui présentent des expressions différentielles au cours des différentes étapes du cycle de développement parasitaire. La validation de cette étude pourra être obtenue lorsque la présence de ces PES *in vivo* aura pu être démontrée. La caractérisation fine des protéines et des protéases permettra de les purifier et de mettre au point des sondes immunologiques et moléculaires permettant de mettre en évidence ces facteurs excrétés-sécrétés au niveau de macrophages infectés. Actuellement divers travaux portent sur la recherche d'inhibiteurs spécifiques de ces activités protéasiques. Le fait que ces protéases puissent être sécrétées accroît leur intérêt. La présence de ces produits d'excrétion-sécrétion *in vivo* et l'étude de leur antigénicité pourraient permettre d'envisager leur présence en tant qu'antigène circulant chez l'hôte. Ainsi, la mise au point de nouveaux tests diagnostics basés sur la reconnaissance de ces antigènes pourrait être réalisée. En effet, les tests actuels sont basés sur la reconnaissance d'anticorps qui ne peuvent être présents lorsque le patient est atteint d'immunodépression. Or actuellement des cas de plus en plus nombreux de coinfection SIDA-leishmaniose sont observés. Cette nouvelle approche pourrait permettre d'obtenir des diagnostics rapides et fiables de leishmaniose, permettant ainsi de soigner plus rapidement les patients.

**REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

1. DESJEUX, P., 1996. Leishmaniasis; public health aspects and control, *Clinics in Dermatology*, **14**, 417-423.
2. Rapport d'un comité de l'OMS d'experts OMS, 1990, Lutte contre les Leishmanioses, Serie de rapport technique 793, OMS Genève 1990.
3. McKERROW, J.H., SUN, E., ROSENTHAL, P.J., and BOUVIER, J., 1993. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa, *Annu.Rev.Microbiol*, **47**, 821-853.
4. COOMBS, G.H., ROBERTSON, C.D., and MOTTRAM, J.C., 1991, Cysteine proteinases of leishmanias, in COOMBS G.H.and NORTH,M.J(Ed), *Biochemical protozoology*, Taylor and Francis, London, 208-220.
5. PELMONT J., 1989. *Enzymes*, Presses Universitaires de Grenoble, Collection Grenoble Science, 381-407.
6. ILG, T., FUCHS, M., GNAU, V., WOLFRAM, M., HARBECKE, D., and OVERATH, P., 1994. Distribution of parasite cysteine proteinases in lesion of mice infected with *Leishmania mexicana* amastigotes, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **67**, 193-203.
7. BOUVIER, J., BORDIER, C., VOGEL, H., REICHEL, T R., and ETGES, R., 1989. Characterization of the promastigote surface protease of *Leishmania* as a membrane-bound zinc endopeptidase, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **37**, 235-246.
8. SCHNEIDER, P., and GLASER, T.A., 1993. Characterization of two soluble metalloexopeptidases in the protozoan parasite *Leishmania major*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **62**, 223-232.
9. ETGES, R., BOUVIER, J., and BORDIER, C., 1986. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease, *The Journal of Biological Chemistry*, **261(20)**, 9098-9101.
10. ETGES, R., and BOUVIER, J., 1991. The promastigote surface proteinase of *Leishmania*, in COOMBS G.H.and NORTH,M.J(Ed), *Biochemical protozoology*, Taylor and Francis, London, 221-234.
11. BRANQUINHA, M.H., VERMELHO, A.B., GOLDENBERG, S., and BONALDO, M.C., 1996. Ubiquity of cysteine- and metalloproteinase activities in a wide range of Trypanosomatids, *J. Euk. Microbiol.*, **43(2)**, 131-135.
12. McMASTER, W.R., MORRISON, C.J., MACDONALD, M.H., and JOSHI, P.B., 1994. Mutational and functional analysis of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63 : similarities to matrix metalloproteinases, *Parasitology*, **108**, S29-S36.
13. BOUVIER, J., SCHNEIDER, P., and ETGES, R., 1995. Leishmaniolyisin : surface metalloproteinase of *Leishmania*, *Methods in Enzymology*, **248**, 614-634.
14. MEDINA-ACOSTA, E., BEVERLEY, S.M., and RUSSEL, D.G., 1993. Evolution and Expression of the *Leishmania* surface proteinase (gp63) gene locus, *Infectious Agents and Disease*, **2**, 25-34.
15. SEAY, M.B., HEARD, P.L., and CHAUDHURI, G., 1996. Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes, *Infection and Immunity*, **64(12)**, 5129-5137.
16. MEDINA-ACOSTA, E., KARESS, R.E., SCHWARTZ, H., and RUSSEL, D.G., 1989. The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **37**, 263-274.
17. MEDINA-ACOSTA, E., KARESS, R.E., and RUSSELL, D.G., 1993. Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **57**, 31-46.

18. ILG, T., HARBECKE, D., and OVERATH, P., 1993. The lysosomal gp63-related protein in *Leishmania mexicana* amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acidic pH optimum, *FEBS Lett.*, **327**, 103-107.
19. BAHR, V., STIERHOF, Y.D., ILG, T., DEMAR, M., QUINTEN, M., and OVERATH, P., 1993. Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **58**, 107-122.
20. SOTERIADOU, K.P., REMOUNDOS, M.S., KATSIKAS, M.C., TZINIA, A.K., TSIKARIS V., SAKARELLO, S C., and TZARTOS, S.J., 1992. The Ser-Arg-Tyr-Asp region of the major surface glycoprotein of *Leishmania* mimics the Arg-Gly-Asp-Ser cell attachment region of fibronectin, *The Journal of Biological Chemistry*, **267**(20), 13980-13985.
21. LIU, X., and CHANG, K.-P., 1992. Extrachromosomal genetic complementation of surface metalloproteinase (gp63)-deficient *Leishmania* increases their binding to macrophages, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, **89**, 4991-4995.
22. CHANG, C.S., INSERRA, T.J., KINK, J.A., FONG, D., and CHANG, K.-P., 1986. Expression of a 63 kilodalton membrane glycoprotein during growth and transformation of *Leishmania mexicana amazonensis*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **18**, 197-210.
23. HANDMAN, E., BUTTON L., and McMASTER R.W., 1990. *Leishmania major*: production of recombinant gp63, its antigenicity and immunogenicity in mice, *Experimental Parasitology*, **70**, 427-435.
24. ABDELHAK, S., LOUZIR, H., TIMM, J., BENLASFAR, Z., LAGRANDERIE, M., GHEORGIU, M., DELLAGI, K., and GICQUEL, B., 1995. Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALB/c mice, *Microbiology*, **141**, 1585-1592.
25. HEAY, A.S., THEANDER, T.G., HVIID, L., HAZRATI, S.M., KEMP, M., and KHARAZMI, A., 1994. The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T cells, *Journal of Immunology*, **152**, 4542-4548.
26. ROBERTSON, C.D., and COOMBS, G.H., 1990. Characterization of three groups of cysteine proteinases in the amastigote of *Leishmania mexicana mexicana*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **42**, 269-276.
27. ROBERTSON, C.D., and COOMBS, G.H., 1993. Cathepsin B-like cysteine proteases of *Leishmania mexicana*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **62**, 271-280.
28. SOUZA, A.E., WAUGH S., COOMBS, G., H., and MOTTRAM, J., C., 1992. Characterization of a multicopy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*, *FEBS Letters*, **311**, 124-127.
29. TRAUB-CSEKO, Y.M., DUBOISE, M., BOUKAI, L.K., and McMAHON-PRATT, D., 1993. Identification of two distinct cysteine proteinase genes of *Leishmania pifanoi* axenic amastigotes using the polymerase chain reaction, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **57**, 101-116.
30. SAKANARI, J.A., NADLER, S., A., CHAN, V., J., ENGEL, J.C., LEPTAK, C., and BOUVIER J., 1997. *Leishmania major* : comparison of the cathepsin L- and B-like with those of other trypanosomatids, *Experimental Parasitology*, **85**, 63-76.
31. DUBOISE, M.S., VANNIER-SANTOS, M.A., COSTA-PINTO, D., RIVAS, L., PAN, A.A., TRAUB-CSEKO, Y., DE SOUZA, W., and McMAHON-PRATT, D., 1994. The biosynthesis, processing and immunolocalization of *Leishmania pifanoi* amastigote cysteine proteinases, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **68**, 119-132.

32. MOTTRAM, J.C., SOUZA, A. E., HUTCHISON, E., RODERICK, C., FRAME, M.J., and COOMBS G.H., 1996. Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cystine proteinases are virulence factors, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **93**, 6008-6013.
33. ALFIERI, S.C., SHAW, E., ZILBERFARD, V., RABINOVITCH, M., 1989. *Leishmania amazonensis* : involvement of cysteine proteinases in the killing of isolated amastigotes by L-leucine methyl ester, *Exp. Parasitol.*, **68**, 423-431.
34. MOTTRAM, J.C.,ROBERTSON, C.D., COOMBS, G.H., and BARRY, J.D., 1992. A developmentally regulated cysteine proteinase gene of *Leishmania mexicana*, *Mol. Microbiol.*, **6**, 1925-1932.
35. BART, G., COOMBS, G.H., and MOTTRAM, J.C., 1995. Isolation of *Imcpc*, a gene encoding a *Leishmania mexicana* cathepsin-B like cysteine proteinase, *Molecular and Biochemecal Parasitology*, **73**, 271-274.
36. LEO, S.D.S., LANG, T., PRINA, E., HELLIO, R., and ANTOINE, J.C., 1995. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecule of their host cells, *Journal of Cell Science*, **108**, 3219-3213.
37. FINKELMAN, F.D., and URBAN, J.F., 1992. Cytokins: making the right choice. *Parasitology Today*, **8**, 311-314.
38. BARRAL, A., BARRAL-NETTO, M., YONG, E.C., BROWNELL, C.E., TWARDZIK, D.R., and REED, S.G., 1993. Transforming growth factor  $\beta$  as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, **90**, 3442-3446.
39. REED, S.G., 1995. Cytokine control of the macrophage parasites *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*, In: Boothroyd J.C. and Komuniecki R. (Eds), *Molecular Approches to Parasitology*, Wiley-Liss, New-York,443-453.
40. GREENBLATT, C.L., and GLASER, P., 1965. Temperature effect on *Leishmania enrietti in vitro*, *Experimental Parasitology*, **16**, 36-52.
- 41.EL-ON, J., SCHNUR, L.F., and GREENBLATT, C.L., 1979. *Leishmania donovani*: physicochemical, and biological characterization of excreted factor from promastigotes, *Experimental Parasitology*, **47**, 254-269.
42. CLINTON, B.A., PALCZUK, N.C., and STAUBER, L.A., 1972. *Leishmania donovani*: partial characterization of some flagellate cytoplasmic immunogens, *J.Immunol.*, **108**, 1570-1577.
- 43.SLUTZKY, G.M., and GREENBLATT, C.L., 1977. Isolation of a carbohydrate-rich immunologically active factor from culture of *Leishmania tropica*, *FEBS Letter*, **80(2)**, 401-405.
44. DECKER-JACKSON J.E., and HONIGBERGn B.M., 1978. Glycoproteins released by *Leishmania donovani* : immunologic relationships with host and bacterial antigens and preliminary biochemical analysis, *J.Protozool.*, **25(4)**, 514-525.
45. SCHNUR, L.F., ZUCKERMAN, A., and GREENBLATT, C.L., 1972. Leishmanial serotypes as distinguished by the gel diffusion of factor excreted *in vitro* and *in vivo*, *Israel Journal of Medical Science*, **8**, 932-942.
46. EL-ON, J.D., SLUTZKY, G., M., GREENBLATT, C., L., ZEHAVI, U., and ABRAHAMS, J., C., 1981, A possible role of leishmanial ecreted-factor in the infectiv process, in *The Biochemistry of Parasites* (in SLUTZKY, Ed), Pergamon Press, New-York, p228.

47. DECKER-JACKSON, J.E., and JANOVY, J.Jr., 1974. *Leishmania donovani* and *Leishmania mexicana*; Production of the excretion factor, *Comparative Biochemistry Physiology*, **49B**, 513-523.
48. SEMPREVIVO, L.H., 1978. Exometabolites of *Leishmania donovani* promastigotes : I. Isolation and initial characterization, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, **159**, 105-110.
49. MUKERJI, K., DAS, A.K., BANERJEE, N., and GHOSH, D.K., 1986. Studies on Exoantigens of *Leishmania donovani*, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, **23**, 148-151.
50. MOODY, S.F., 1993. Molecular variation in *Leishmania*, *Acta Tropica*, **53**, 185-204.
51. BATES, P.A., and DWYER, D.M., 1987. Biosynthesis and secretion of acid phosphatase by *Leishmania donovani* promastigotes, *Mol.Biochem.Parasitol.*, **26**, 289-296.
52. JAFFE, C.L., PEREZ, M.L., and SCHNUR, L.F., 1990. Lipophosphoglycan and secreted acid phosphatase of *Leishmania tropica* share species-specific epitopes, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **41**, 233-240.
53. ILG, T., HARBECKE, D., WIESE, M., and OVERATH, P., 1993. Monoclonal antibodies directed against *Leishmania* secreted acid phosphatase and lipophosphoglycan, partial characterization of private and public epitopes, *Eur.J.Biochem.*, **217**, 603-615.
54. ILG, T., STIERHOF, Y.D., ETGES, R., ADRIAN, M., HARBECKE, D., and OVERATH, P., 1991. Secreted acid phosphatase of *Leishmania mexicana* : a filamentous phosphoglycoprotein polymer, *Proc.Natl.Ac.Sci.USA*. **88**, 8774-8778.
55. TURCO, S.J., 1988. The lipophosphoglycan of *Leishmania*, *Parasitology Today*, **4** (9), 255-257.
56. ILG, T., ETGES, R., OVERATH, P., McCONVILLE, M.J., THOMAS-OATES, J., THOMAS, J., HOMANS, S.W., and FERGUSON, M.A., 1992. Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan, *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 6834-6840.
57. LONDNER, M.V., FRANKENBURG, S., SLUTZKY, G.M., and GREENBLATT, C.L., 1983. Action of leishmanial excreted factor (EF) on human lymphocyte blast transformation, *Parasite Immunology*, **5**, 249-256.
58. SLUTZKY, G.M., and GREENBLATT, C.L., 1979. Analyse by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of an immunologically active factor of *Leishmania tropica* from growth media, promastigotes, and infected macrophages, *Biochem. Med.*, **21**, 70-77.
59. EL-ON, J.D., BRADLEY, D.J., and FREEMAN, J.C., 1980. *Leishmania donovani* action of excreted factor (EF) upon the hydrolytic enzyme activity of macrophage from mice with genetically different resistance to infection, *Experimental Parasitology*, **49**, 167-174.
60. SCHLEIN, Y., JACOBSON, R.L., and SHLOMAI, J., 1991. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector, *Proceeding of the Royal Society of London-Series B: Biological Sciences*, **245**(1313), 121-126.
61. LEWIS, D.H., and PETERS, W., 1977. The resistance of intracellular *Leishmania* parasites to digestion by lysosomal enzymes, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **71**(3), 295-312.
62. ROCHEFORT, H., CAPONY, F., 1991. Protéases lysosomiales et invasion tumorale, *Médecine/Sciences*, **7**, 30-36.
63. LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
64. PRAL, E.M.F., BIJOVSKY, A.T., BALANCO, J.M.F., and ALFIERI, S.C., 1993. *Leishmania mexicana*: proteinase activities and megasomes in axenically cultivated amastigote-like forms, *Experimental Parasitology*, **77**, 62-73.

65. FUNK, V.A., JARDIM, A., and OLAFSON, R.W., 1994. An investigation into the significance of the N-linked oligosaccharides of gp63, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **63**, 23-35.

# **PROJET DE RECHERCHE**

# Sujet de thèse

**Laboratoire d'accueil:** Laboratoire de Biologie Parasitaire, ORSTOM Montpellier.

**Directeur de thèse:** Dr Jean-Loup Lemesre

## Problématique

Toutes les leishmanies évoluent durant leur cycle de développement sous deux formes principales: une forme promastigote flagellée extracellulaire, chez l'insecte vecteur, et une forme amastigote intracellulaire, non mobile, dans les macrophages de l'hôte vertébré. Après injection chez l'hôte par le phlébotome des formes promastigotes métacycliques puis l'attachement et l'endocytose de ces derniers par les macrophages, ils se différencient en formes amastigotes qui vont survivre et se multiplier à l'intérieur des phagolysosomes. L'avirulence ou la perte d'infectivité des formes promastigotes peut être la conséquence de l'inhibition de l'une ou de plusieurs de ces étapes (Moody *et al*, 1993).

La glycoprotéine gp63, une métalloprotéase à zinc, présente de façon majoritaire ( $5 \cdot 10^5$  copies par cellule) à la surface des formes promastigotes de toutes les leishmanies étudiées (Moody *et al*, 1993), semble jouer un rôle essentiel dans l'interaction parasite/macrophage et donc dans l'installation et la propagation du parasite chez l'hôte. Plus récemment, différents travaux ont montré que cette molécule était exprimée chez la forme amastigote sans pouvoir déterminer son rôle et sa localisation précise puisqu'elle n'y serait pas ou peu exprimée en surface (Medina-Acosta *et al*, 1989, Frommel *et al*, 1990, Bahr *et al*, 1993).

Des travaux récents menés sur *Leishmania chagasi* démontrent que l'infectivité qui accompagne la métacyclogénèse est associée à l'apparition d'une nouvelle isoforme de 59 kDa de la gp63 (Roberts *et al*, 1995). De plus, une culture à long terme de ces formes promastigotes s'accompagne, simultanément, de la diminution de l'infectivité et de la diminution progressive de l'expression de cette isoforme.

Des travaux réalisés dans le laboratoire de Biologie Parasitaire sur *Leishmania amazonensis*, responsable de la leishmaniose cutanéomuqueuse du Nouveau Monde, montrent que l'augmentation de l'infectivité des formes promastigotes qui accompagne la métacyclogénèse est corrélée, cette fois, à l'augmentation progressive d'une activité métalloprotéase correspondant à un sous produit de la gp63. Cette dernière ne s'exprime plus chez les formes promastigotes cultivées à long terme. De plus, des souches atténuées ou avirulentes de *L. amazonensis* présentent la particularité de ne plus exprimer cette activité protéasique à leur surface. Des expériences d'infectivité *in vitro* ont montré qu'elles sont capables de s'attacher au macrophage, d'y pénétrer et de s'y différencier en formes amastigotes mais ne peuvent survivre à l'intérieur du phagolysosome contrairement à la souche mère virulente. Grâce à la réalisation *in vitro* du cycle évolutif des leishmanies en condition axénique, il a été possible de montrer que des modifications de l'expression de cette activité métalloprotéase chez les formes promastigotes représentent un événement essentiel dans la capacité des formes amastigotes à proliférer et se différencier.

La présence des différents sous-produits de la gp63 conférant une activité métalloprotéase serait due, soit à la présence de molécules présentant des degrés de glycosylation différents (Funk *et al*, 1994), soit à l'expression différentielle de gènes codants pour des isoformes de la famille de la gp63 (Medina-Acosta *et al* , 1993, Roberts *et al*, 1993).

## Projet de recherche

### 1. Objectifs

Etude des mécanismes de l'infectivité et de la virulence de *Leishmania amazonensis* par l'analyse de l'expression différentielle de la gp63. Une attention particulière sera donnée à son implication dans l'établissement des différentes séquences du cycle de développement parasitaire (maturation des formes amastigotes et promastigotes et différenciation de l'une vers l'autre).

### 2. Moyens

#### 2.1. Les modèles expérimentaux mis au point

Deux modèles expérimentaux mis au point dans le laboratoire sont essentiels à la réalisation de ce projet:

- le cycle *in vitro* de développement parasitaire de *Leishmania amazonensis* en condition axénique dans un milieu complètement défini ayant la particularité de ne contenir aucune macromolécule en tant que substitut sérique;

- un clone avirulent de *Leishmania amazonensis* dont le phénotype est, soit associé à l'expression différentielle de l'une des isoformes de la gp63 , soit à la perte de l'activité métalloprotéase correspondante.

2.2. La possibilité de réaliser une caractérisation fine de l'expression différentielle des isoformes de la gp63 et de leur activité métalloprotéase, au cours du cycle de développement parasitaire du clone avirulent en comparaison avec la souche mère.

Nous procéderons donc à:

- l'analyse de l'activité protéolytique métalloprotéase par analyse électrophorétique en gel d'empreinte;

- la caractérisation antigénique des différentes molécules de la gp63 (immunogène majeur de surface des formes promastigotes) à l'aide de sondes immunologiques (anticorps polyclonaux monospécifiques et/ou anticorps monoclonaux) générées contre la forme membranaire ou contre la forme soluble (sérum dirigé contre les produits d'excrétion-sécrétion) de la gp63 ;

- l'étude de la compartimentation de la gp63 par immunofluorescence indirecte et immunomarquage à l'or colloïdal en utilisant soit des sondes immunologiques, soit des substrats spécifiques ou des inhibiteurs marqués.

2.3. Eventuelle potentialité des souches atténuées ou avirulentes à induire une immunité protectrice

### 3. Attendus et valorisations éventuelles

- étude des mécanismes d'acquisition et de régulation de la virulence au cours du cycle *in vitro*;

- obtention de marqueurs de virulence;
- mise en évidence de nouvelles cibles antigéniques et médicamenteuses,
- obtention de préparations vaccinales accessibles aux pays concernés.

## **Intégration dans les thématiques du laboratoire d'accueil**

Ce projet s'insère dans une thématique plus large, développée par le laboratoire de Biologie Parasitaire au cours de ces quatre dernières années et concernant l'étude des facteurs impliqués dans la pathogénicité des leishmanies.

## **Publications du laboratoire d'accueil dans le domaine**

SANTORO, F., KWEIDER, M., LEMESRE, J.L., DARCY, F., and RIZVI, F.S., 1987. Infectivity of *Leishmania* promastigotes is dependent on the expression of a 65 000 dalton surface antigen. Nato ASI Series, Vol. H11. *Host-Parasite Cellular and Molecular Interactions in Protozoal Infections*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 117-122.

KWEIDER, M., LEMESRE, J.L., DARCY, F., KUSNIERZ, J.P., CAPRON, A., and SANTORO, F., 1987. Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the surface expression of a 65 000 dalton antigen. *Journal of Immunology*, **138**, 299-305.

LEMESRE, J.L., SANTORO, F., LOYENS, M., SADIGURSKY, M., et CAPRON, A., 1988. Autorégulation de la croissance des *Trypanosomatidae in vitro*. *C. R. Acad. Sciences Paris*, **307 III**, 283-288.

KWEIDER, M., LEMESRE, J.L., SANTORO, F., SADIGURSKY, M., and CAPRON, A., 1989. Development of metacyclic *Leishmania* promastigotes is associated with the increasing expression of GP65, the major surface antigen. *Parasite Immunology*, **11**, 197-209.

LEMESRE, J.L., BLANC, M.P., GREBAUT, P., ZILBERFARB, V., et CARRIERE, V., 1994. Culture continue de formes amastigotes de Leishmanies en condition axénique. Réalisation du cycle évolutif *in vitro*, *Médecine et Armées*, **22**, 99.

LEMESRE, J.L. (1994). "Method for the culture *in vitro* of different stages of tissue parasites". Brevet d'invention international, PCT/FR N° 94/00577.

SERENO, D., and LEMESRE, J.L. (1997). Use of an enzymatic *in vitro* micromethod to quantify parasite number and mitochondrial activity of axenically-grown amastigotes of *Leishmania*, *Parasitology Research*, (in press).

LEMESRE, J.L., SERENO, D., DAULOUEDE, S., VEYRET, B., BRAJON, N. and VINCENDEAU, P. (1997). *Leishmania spp*: Nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically-grown amastigote forms, *Experimental Parasitology*, (in press)

SERENO D. and LEMESRE J.L. (1997). An *in vitro* model using axenically-cultured amastigote forms for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* (in press).

## Moyens financiers pour le soutien du programme de travail

Financements institutionnels (ORSTOM) et extérieurs (industriels).

### Collaborations

- Institut de Botanique, Montpellier (A. Ouassi);
- Université de Bordeaux, laboratoire de Parasitologie (P. Vincendeau);
- IBBA (Institut Bolivien de Biologie d'Altitude), La Paz (F. Le Pont).

### Bibliographie

- BAHR, V., STIERHOF, Y.-D., ILG, T., DEMAR, M., QUINTEN, M., and OVERATH, P., 1993. Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **58**, 107-122.
- FROMMEL, T.O., BUTTON, L.L., FUJIKURA, Y., and McMASTER, W.R. (1990). The major surface glycoprotein (GP63) is present in both life stage of *Leishmania*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **38**, 25-32.
- FUNK, V.A., JARDIM, A., and OLAFSON, R.W. (1994). An investigation into the significance of the N-linked oligosaccharides of *Leishmania* gp63, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **63**, 23-35.
- MEDINA-ACOSTA, E., KARESS, R.E., SCHWARTZ, H., and RUSSEL, D.G. (1989). The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **37**, 263-374.
- MEDINA-ACOSTA, E., KARESS, R.E., and RUSSEL, D.G. (1993). Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **57**, 31-46.
- MOODY, S.F. (1993). Molecular variation in *Leishmania*, *Acta Tropica*, **53**, 185-204.
- ROBERTS, S.C., SWIHART, K.G., AGEY, M.W., RAMAMOORTHY, R., WILSON, M.E., and DONELSON J.E. (1993). Sequence diversity and organization of the *msp* gene family encoding gp63 of *Leishmania chagasi*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **62**, 157-172.
- ROBERTS, S.C., WILSON, M.E., and DONELSON, J.E. (1995). Developmentally regulated expression of a novel 59-kDa product of the major surface protease (Msp or gp63) gene family of *Leishmania chagasi*, *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 8884-8892.