



FACULTE DES SCIENCES

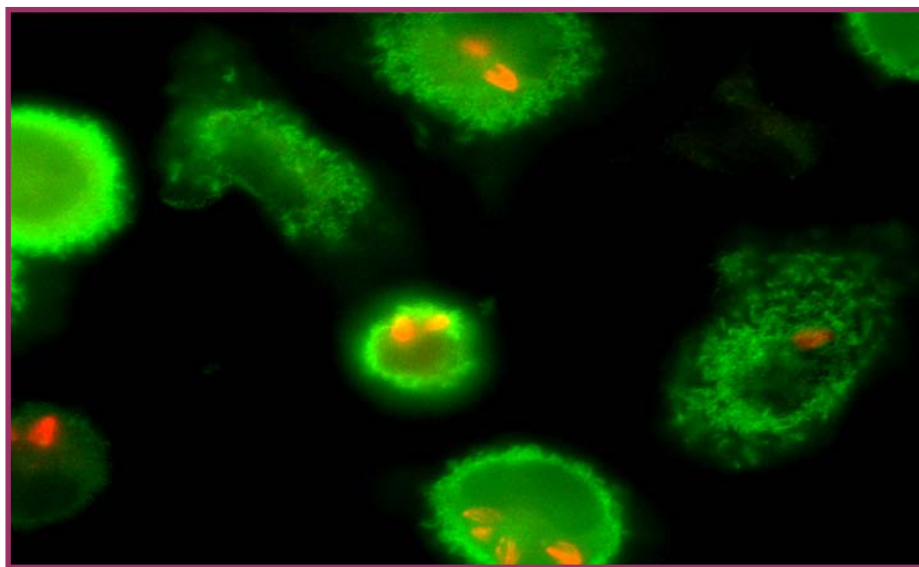
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de magister en Biologie
Option : Biochimie appliquée

**Contribution à l'étude du rôle des anticorps
dans la maturation des leucocytes dendritiques
murins induite par divers stades du parasite
*Leishmania amazonensis***

Présenté par : M. ABDI Sofiane Zaki



Soutenu en Octobre 2004

Devant la commission d'examen :

**PRESIDENT :
DIRECTEUR DE
THESE :**

M. LADJAMA A.

Professeur

Université d'Annaba

EXAMINATEURS :

M. BOUZERNA N.

Professeur

Université d'Annaba

M. TAHRAOUI K.

Professeur

Université d'Annaba

M. Dr. KECHRID Z.

Maître de conférence

Université d'Annaba

Introduction

Les leishmanies, parasites protozoaires flagellés appartenant à l'ordre des Kinetoplastidae, sont les agents causals de parasitoses animales et humaines. Elles provoquent des infections connues sous le terme de leishmanioses. La plupart des leishmanioses humaines sont zoonotiques.

Trois types principaux de leishmanioses ont été décrits chez l'homme [Jarry D. M., 1999] : cutanée (LC) ; viscérale (LV) ou Kala-azar, mortel en absence de traitement ; cutanéomuqueuse (LCM).

En Algérie, seule la leishmaniose cutanée et à un degré moindre la leishmaniose viscérale sévissent en Algérie.

Selon l'OMS environ 350 millions de personnes sont exposés au risque de contracter une leishmaniose et le nombre de personnes infectés par différentes espèces de leishmanies s'élève, en 2002, à quelque 12 millions. Environ 400 000 nouveaux cas de LC apparaissent chaque année. Ceci a amené l'OMS à classer la LC au 6^{ème} rang des plus importantes maladies tropicales.

Cette situation préoccupante tend à s'amplifier avec la co-infection *Leishmania*-VIH fréquentes dans plusieurs régions notamment le bassin méditerranéen.

Les leishmanies se multiplient sous deux formes dites promastigote et amastigote qu'elles revêtent chez deux hôtes distincts, à savoir des diptères hématophages appelés phlébotomes ou sandfly (seules les femelles sont hématophages) et des mammifères, dont l'homme (les mammifères sont les réservoirs potentiels du parasite, l'homme est cependant considéré comme hôte accidentel). Dans les phlébotomes, les promastigotes sont des parasites extracellulaires qui vivent et se multiplient dans le tractus digestif. Ils vont y subir une différenciation, la métacyclogenèse, qui va aboutir à la formation de promastigotes dit métacycliques, très infectieux pour l'hôte mammalien. Chez ce dernier, les *Leishmania* sont des parasites intracellulaires obligatoires qui vivent et se multiplient principalement -voire uniquement- dans les macrophages (MΦ) au sein de compartiments situés sur les voies de phagocytose et d'endocytose, les vacuoles parasitophores (VP) [Antoine et al., 1999]

b]. On admet généralement que seules les formes promastigotes métacycliques sont inoculées dans le derme des mammifères par les phlébotomes infectés. A ce niveau, ces formes parasitaires sont vraisemblablement très rapidement phagocytées par des cellules résidentes ou recrutées comme des MΦ, des leucocytes dendritiques (LD), des polynucléaires. On ignore encore largement les parts respectives assumées par ces différents types cellulaires dans les toutes premières phases de l'infection, mais également dans les phases chroniques du parasitisme.

Il a été clairement établi, chez les hôtes mammaliens, que les lymphocytes T (LT) CD4⁺ jouent un rôle crucial dans les mécanismes de protection élaborés contre les *Leishmania* (LT CD4⁺ Th1). Mais ces lymphocytes favorisent aussi le développement des parasitoses chez certaines lignées de souris et chez certains patients (LT CD4⁺ Th2) [Reiner and Locksley, 1995]. Ceci a été particulièrement bien démontré chez la souris qui, au laboratoire, est utilisée comme modèle expérimental. La nature des cellules présentatrices d'antigène (CPAg) impliquées dans l'activation des LT CD4⁺ qui, rappelons-le, reconnaissent des peptides liés à des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), reste par contre à préciser et l'un des projets du laboratoire s'inscrit dans le cadre de leur caractérisation [Antoine et al., 1998 ; Lang et al., 2000].

Une partie importante du travail du laboratoire a été consacrée à l'étude des interactions qui s'établissent entre les MΦ (cellules présentatrices d'antigènes parasitaires potentielles) et les promastigotes ou les amastigotes de *Leishmania* (phagocytose des parasites, biogenèse des VP, présentation d'Ag par les MΦ infectés) [Prina et al., 1993 ; Prina et al., 1996 ; Antoine et al., 1998 ; Courret et al., 1999 ; Courret et al., 2002]. Les *Leishmania* interagissent également avec d'autres CPAg du système immunitaire et notamment avec les LD [Moll et al., 1993, 2000]. Les LD constituent une famille de cellules jouant un rôle primordial dans le fonctionnement du système immunitaire [Lotze et Thomson, 2001]. Hormis leur très grande capacité à activer des LT CD4⁺ naïfs via la présentation d'Ag qu'ils ont captés, un des rôles majeurs des LD est d'assurer le transport de ces Ag des tissus non lymphoïdes "périphériques" vers les organes lymphoïdes secondaires drainants, sites où les réponses immunitaires adaptatives sont initiées. Ces processus sont très finement régulés et sont sous la dépendance d'une maturation des LD engagés qui se traduit notamment par une augmentation de l'expression de molécules de classe II et de molécules de co-signalisation à la surface

cellulaire ainsi que par l'expression de différents récepteurs de chimiokines et de protéines d'adhésion. De ces remaniements résulte une capacité accrue à présenter des Ag et à activer des LT. D'autre part, ils assurent un positionnement précis de ces cellules dans les organes lymphoïdes. En fonction des sous-populations de LD impliquées et des cytokines qu'ils sont capables d'exprimer ou bien en fonction du degré d'activation/de maturation que les LD atteignent après contact avec un stimulus, on considère qu'ils peuvent aussi jouer un rôle important dans l'orientation Th1 ou Th2 des réponses immunitaires T-dépendantes [Moser et al., 2000]. Il a également été montré que les LD immatures chargés en Ag peuvent induire l'apparition de LT CD4⁺ régulateurs (cellules T_{reg}) capables d'inhiber la prolifération/l'activation de LT CD4⁺ naïfs, spécifiques d'Ag. En présence d'IL-10, des LD immatures contenant des Ag peuvent aussi conduire les LT CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques qu'ils rencontrent vers un état d'anergie [Jonuleit et al., 2001]. Enfin, ils sont aussi à l'origine de réponses cytotoxiques soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire de cellules T cytotoxiques CD8⁺ dont ils induisent l'activation [Steinman et al., 2001].

Dans la mesure où les LD jouent un rôle clé dans l'induction/la modulation des réponses T-dépendantes, il est important de préciser les types d'interactions qui s'établissent entre ceux-ci et les leishmanies. Il sera notamment important de déterminer si les LD peuvent assurer la survie voire la multiplication des pathogènes. Dans l'affirmative, et à plus long terme, nous essaierons de savoir si les stratégies que ces pathogènes développent pour faire face aux conditions rencontrées dans les MΦ sont également utilisées dans les LD et un point très important sera évidemment d'examiner si les LD infectés peuvent présenter des Ag parasitaires. D'autre part, certains résultats obtenus par différents laboratoires sont contradictoires notamment ceux concernant la capacité des leishmanies (promastigotes ou amastigotes) à induire la maturation des LD, une étape de différenciation clé pour la présentation d'Ag et pour l'activation des LT CD4⁺ comme nous l'avons déjà signalé ci-dessus. Par exemple, une maturation des LD induite par les deux stades parasitaires promastigote et amastigote a été décrite par certains groupes [Qi et al., 2001] alors que d'autres observent que seuls les amastigotes sont capables de faire maturer les LD [Von Stebut et al., 1998, 2000] et que d'autres encore, concluent de leurs études que ni les promastigotes ni les amastigotes ne sont aptes à induire une maturation des LD [Bennett et al., 2001]. L'origine de ces différences pourrait être liée au type de LD utilisés (LD dérivés de précurseurs médullaires murins ou de monocytes sanguins humains, LD dérivés de peau de fœtus de

souris, LD de rate de souris), à l'espèce de *Leishmania* mise en contact avec les LD (*L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*), au mode d'obtention des différents stades parasitaires (production *in vitro* pour les promastigotes, production *in vitro* ou à partir de souris infectées pour les amastigotes), à la présence ou non, à la surface des parasites, de molécules exogènes facilitant leur liaison et leur internalisation par les cellules phagocytaires [complément, immunoglobulines (Ig)... etc.].

Le rôle de certains de ces facteurs dans la maturation des LD mis en contact avec des leishmanies a été testé dans le travail que je présente ci-après. Pour ce faire, des LD de souris BALB/c dérivés de précurseurs médullaires ont été préparés et incubés avec des promastigotes ou des amastigotes de *L. amazonensis* préparés de diverses manières ou d'origine différente et recouverts ou non d'anticorps (Ac) spécifiques. Les résultats montrent qu'en l'absence d'Ac, les deux formes parasitaires peuvent être phagocytées par les LD mais n'induisent pas ou que très faiblement une maturation de ces derniers (mesurée après 24 h de contact avec les parasites). La présence d'Ac sur la membrane plasmique des parasites entraîne une phagocytose accrue par les LD et déclenche une maturation des LD quelle que soit la forme parasitaire internalisée. Les résultats sont intéressants à discuter dans le cadre des "stratégies" utilisées par ces parasites pour s'établir dans leurs hôtes mammaliens.

I. Généralités

A) Définition

Les leishmanioses sont des parasitoses dues à l'infection de l'Homme par un protozoaire flagellé appartenant au genre *Leishmania*. Les leishmanioses affectent de très nombreuses espèces de mammifères domestiques (notamment le chien) ou sauvages (rongeur tel *Psammomys obesus*) et sont transmises dans la nature par la piqûre infestante d'un phlébotome vecteur.

B) Types de leishmanies :

Trois formes principales de leishmanioses ont été décrites chez l'homme [Jarry D. M., 1999] :

- les leishmanioses cutanées (LC), causées par de nombreuses espèces de leishmanies, telles que *L. tropica*, *L. major* (dans l'ancien monde) – en Algérie, *L. major* est responsable du clou de Biskra - et *L. mexicana*, *L. amazonensis* (dans le nouveau monde).

Les réservoirs des parasites sont domestiques représentés essentiellement par le chien contaminé. Ils sont également sauvages, les rongeurs en particulier ; pour l'Algérie c'est le mérion chawi et *Psammomys obesus* (le rat des champs et le rat des sables) qui sont les principaux réservoirs de la LC.

La LC est, en l'absence de surinfections, une maladie bénigne ; la cicatrisation des lésions est spontanée en quelques mois mais laisse des cicatrisations indélébiles qui peuvent être évitées par le traitement (fig. 1).

- les leishmanioses viscérales (LV) ou Kala-azar, provoquées dans l'ancien monde, par des espèces appartenant à deux complexes systématiques : *L. infantum* et *L. donovani*. Les LV sont les formes les plus graves de cette famille de maladies puisque la mortalité avoisine les 100% chez les patients symptomatiques en l'absence de traitement. L'agent responsable de la LV américaine est *L. chagasi* qui, selon de nombreux critères, est

considéré comme étant identique à *L. infantum*. En Algérie la LV est due à *L. infantum*, le réservoir essentiel de cette grave affection reste le chien (fig. 2).

- les leishmanioses cutanéomuqueuses (LCM) dues principalement à *L. braziliensis* dont la répartition géographique est restreinte au nouveau monde (fig. 3).



Figure 1 : Leishmaniose cutanée due à *Leishmania major*.

- A) Forme macrocheilite.
- B) Forme ulcérée.
- C) Bouton d'orient.
- D) Nodules tumoraux.



Figure 2 : Leishmaniose viscérale.

A) Leishmaniose viscérale due à *Leishmania donovani* (Kala-azar).

B) Co-infection LV + LC (*L. infantum* et *L. mexicana*).



Figure 3 : Leishmaniose cutanéomuqueuse.

A) Graves mutilations faciales.

B) Effondrement de la cloison nasale.

C) Historique :

Le parasite *leishmania* fut découvert par Sir William Leishman en 1900 dans des frottis de la rate d'un soldat mort de fièvre à Dum-Dum en Inde. Historiquement, les leishmanioses constituent des affections cutanées déjà connues dans la haute antiquité.

Au X^e siècle Al Boukhari, un médecin arabe, décrit cette affection cutanée et Avicenne, mort en 1034, l'attribuait (sans trop se tromper) à une piqûre de moustique.

Le Bouton d'Orient, synonyme du Bouton de Biskra, a été signalé en Tunisie dans la région de Gafsa (Deperet & Boinet, 1884).

En Algérie, la forme cutanée a été rapportée dès 1860 par Hamel et le premier cas Algérien de LV est décrit en 1911 par Lemaire.

D) L'Agent vecteur :

L'agent de transmission de la leishmaniose est le phlébotome (Fig. 4). C'est un petit insecte velu, au vol silencieux, particulièrement actif dès le crépuscule et pratiquement toute la nuit. Seule le phlébotome femelle est hématophage ; il est actif à la fin du printemps (Mai-juin) jusqu'au milieu de l'automne ; suivant la climatologie locale, cette activité peut débuter plutôt et finir beaucoup plus tard.

Dans la journée, le phlébotome vit dans les anfractuosités des roches, fissures murales, mures en pierres sèches. Seule la femelle pique, elle pond ses œufs dans le sable d'où sortent des larves terrestres puis des nymphes qui donnent naissance à des adultes mâles et femelles.

De nombreuses espèces de phlébotomes existent dans le monde. Environ 19 espèces ont été confirmées comme vecteurs de différentes espèces de leishmanies ; cependant, chaque espèce de *Leishmania* est inféodée à une seule ou à quelques espèces seulement de phlébotomes [Walters et al., 1993 ; Antoine et al., 1999]. C'est dire l'importance de l'identification précise de l'espèce dans tout programme de développement de lutte contre cette maladie.

La traction des phlébotomes vers l'humain semble dépendre de la production de CO₂ par ce dernier mais également de son odeur.



Figure 4 : Phlébotome femelle (*Phlebotomus papatasi*).

E) Epidémiologie géographique :

Les leishmanioses sont présentes dans les cinq continents, dans les zones tropicales et subtropicales de 88 pays dont 72 pays en développement (Fig. 5). Les zones d'endémie sont l'Europe du sud ainsi que de nombreux pays en voie de développement d'Afrique dont l'Algérie, du Moyen Orient, d'Asie, d'Amérique centrale et d'Amérique du sud.

La prévalence mondiale est estimée à 12 millions de cas ; l'incidence des leishmanioses est en augmentation dans le monde : 1500 000 à 2000 000 de nouveaux cas par an pour la LC et 500 000 pour la LV. Cette situation alarmante résulte de l'augmentation de la transmission vectorielle et pour la LV de l'augmentation du réservoir humain lié à l'infection au VIH/SIDA. Actuellement, l'intérêt de l'étude des leishmanioses est double ; il est lié d'une part à l'existence de la co-infection *Leishmania*-VIH essentiellement LV, maladie émergente notamment en Europe méridionale (Espagne, France, Italie et Portugal) mais en Afrique orientale (Ethiopie) et d'autre part la recrudescence inquiétante du nombre de cas de LC avec l'apparition de nouveaux foyers d'infection dans les pays où la co-infection *Leishmania*-VIH est rare.

En Algérie, on assiste également à une augmentation, voire, une extension du nombre de micro-foyers individualisés au nord du pays. Les foyers traditionnels de LV sont la Kabylie et le Tell et pour la LC la région de Biskra et Abadla.

Depuis 1981, cette épidémiologie géographique a connu de grands changements ; il n'y a plus de frontières entre les zones à LC et les zones à LV. La co-existence de ces deux types de leishmanioses dans une même région s'explique par la mise en évidence, par des études de l'existence de variants enzymatiques du parasite : existence de variant de *L. infantum* chez des leishmaniens vivants dans l'entourage d'un malade ayant contracté la LC (habituellement *L. major*).

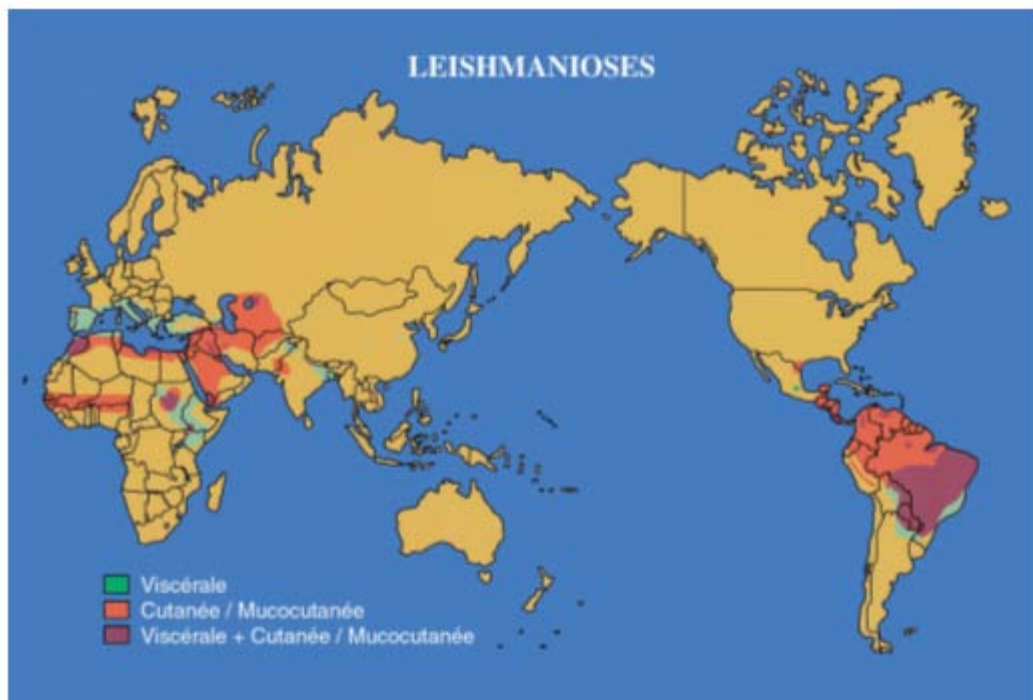


Figure 5 : Distribution de la leishmaniose dans le monde.

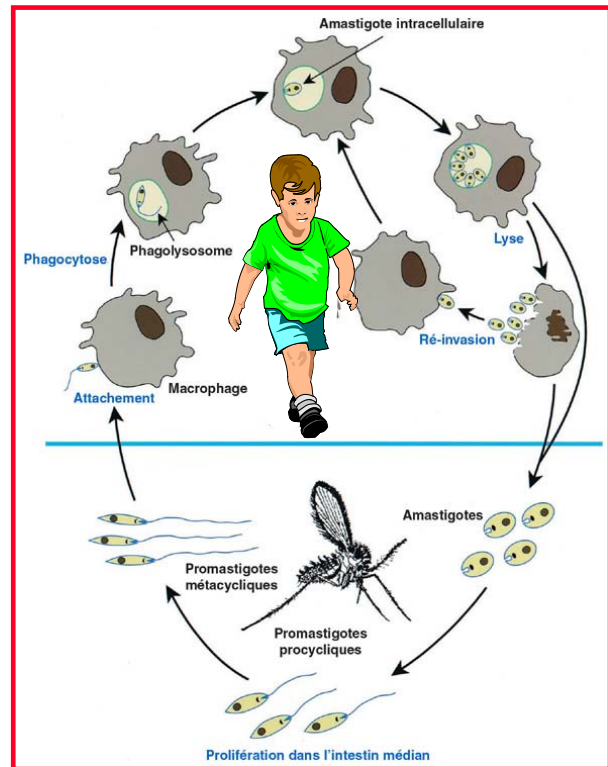
F) Cycle de *Leishmania* :

Le parasite *Leishmania* a un cycle de vie dimorphique nécessitant deux hôtes distincts : le phlébotome vecteur et un mammifère réservoir (Fig. 6).

Le parasite est transmis, au niveau du derme, lors d'un repas sanguin, par le phlébotome femelle infecté à l'hôte mammalien (Homme, chien, ...etc.) sous forme de promastigotes métacycliques infectieux. Ces derniers sont aussitôt phagocytés par les MΦ. Dans les MΦ, ils se transforment en amastigotes puis se multiplient jusqu'à l'éclatement du MΦ.

Les amastigotes libérés infectent, pour partie, d'autres MΦ sains entretenant la perpétuation du cycle, l'autre partie va être ingérée à l'occasion d'un repas sanguin par un phlébotome sain qui sera à son tour infecté ; il contaminera à son tour d'autres hôtes mammaliens.

Figure 6 : Cycle de *leishmania*.



II. Biologie cellulaire de *Leishmania*.

Les *Leishmania*, parasites protozoaires, se présentent à leurs hôtes successifs sous deux stades morphologiques principaux : les promastigotes et les amastigotes.

Les promastigotes sont des parasites extracellulaires très mobiles vivant dans le tube digestif du diptère hématophage, le phlébotome. Ils présentent un corps plus ou moins fuselé de 5 à 20 μm de longueur et de 1 à 4 μm de largeur prolongé au niveau du pôle antérieur par un flagelle qui peut atteindre jusqu'à 20 μm de longueur (Fig. 7-A).

Les amastigotes, pour leur part, vivent à l'intérieur de MΦ de mammifères, au sein de vacuoles dites parasitophores (VP), ils présentent un corps beaucoup plus ramassé d'environ 4 µm de longueur et 2 µm de largeur, ils sont munis d'un très court flagelle ou rhizoplaste, ne dépassant pas le corps cellulaire (Fig. 7-B).

Un troisième morphotype, connu sous le terme de paramastigote, a été identifié, cette forme colonise le pharynx et l'intestin postérieur du phlébotome infecté. Les paramastigotes ont un corps ramassé de 5 à 6 µm de longueur sur 2 à 6 µm de largeur, ils sont munis d'un flagelle court. La position de ce morphotype dans le cycle biologique du parasite n'est pas claire. Est-il l'aboutissement d'une voie de différenciation abortive des promastigotes ne conduisant pas à la formation de promastigotes infectieux pour les mammifères ? Ou bien participe-t-il à l'infection des mammifères ? Ces questions restent pour l'instant sans réponse. En tout cas, les paramastigotes n'ont pas été clairement identifiés dans les cultures *in vitro* de *Leishmania* (cultures qui essaient de reproduire quelques-unes des conditions rencontrées dans le tube digestif des diptères telle que la température, la présence de sang, d'hémoglobine ou de produits de dégradation de l'hémoglobine).

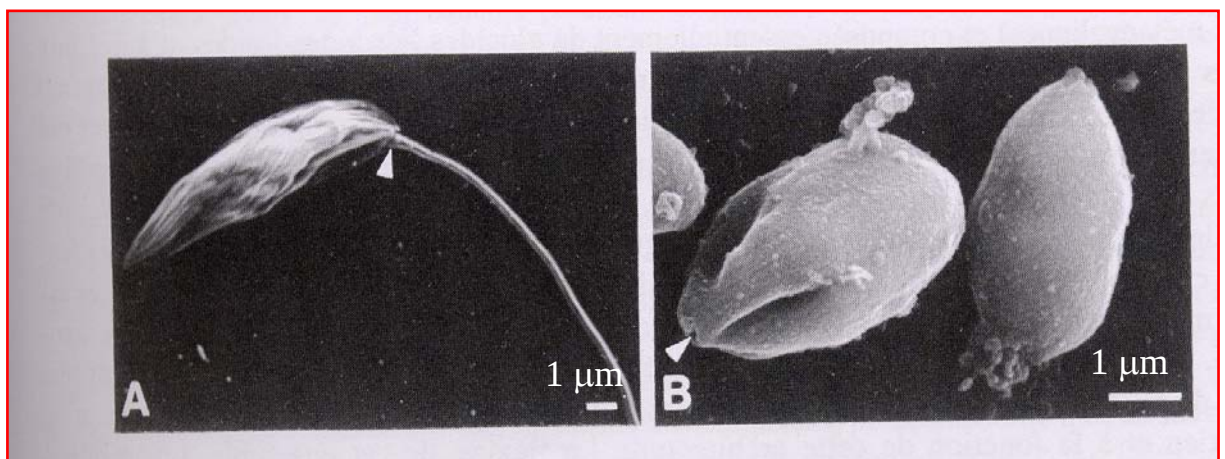


Figure 7. Promastigote (A) et amastigotes (B) de *Leishmania amazonensis* examinés par microscopie électronique à balayage. Têtes de flèche: ouverture de la poche flagellaire.

A) Organisation structurale des *Leishmania*.

1- Ultrastructure des *Leishmania*.

Les *Leishmania* sont des protozoaires relativement évolués chez lesquels on peut observer la plupart des organites caractéristiques des cellules eucaryotes supérieures (Fig. 8), (Fig. 9-A et B) [Antoine et al., 1999]. Elles sont entourées par une membrane plasmique qui, sur sa face externe, présente une enveloppe cellulaire ou glycocalyx d'épaisseur variable selon les phases du cycle (mince chez les promastigotes en phase de croissance et les amastigotes, large chez les promastigotes infectieux métacycliques) et composée essentiellement de glucides liés à des lipides et à des protéines membranaires. La membrane plasmique est bordée sur sa face interne par un corset de microtubules stables, arrangés en spirales et qui assurent le maintien de la forme cellulaire. Jusqu'à présent, il n'a pas été détecté d'autres filaments du cytosquelette (microtubules labiles, filaments d'actine, filaments intermédiaires) dans le cytoplasme des *Leishmania* et ce, malgré le fait que des gènes d'actine aient été identifiés. Le flagelle qui émane de la partie antérieure des parasites est également riche en microtubules stables associés en une structure complexe nommée axonème. Ce dernier est formé de 9 paires de microtubules agencées en anneau et enserrant une paire de microtubules centrale.

De nombreuses protéines autres que la tubuline participent au maintien et à la fonction de cette architecture. La flexion de cet ensemble, qui requiert l'hydrolyse d'ATP, assure la mobilité des promastigotes. L'axonème a pour origine les corpuscules basaux, organites apparentés aux centrioles et situés à proximité du kinétoplaste.

La base du flagelle est entourée par une invagination de la membrane plasmique, la poche flagellaire. Cette portion de la membrane plasmique est la seule, avec l'apex des parasites, qui soit dépourvue de microtubules corticaux. De ce fait, c'est la région principale, voire unique, où les vésicules provenant du très proche appareil de Golgi peuvent fusionner avec la membrane plasmique et d'où des vésicules d'endocytose peuvent s'invaginer. Cependant, la poche flagellaire n'est pas complètement ouverte vers le milieu extracellulaire puisqu'elle est au moins partiellement obturée par des jonctions d'ancrage de type desmosome qui, au niveau de l'émergence du flagelle, relie sa membrane à celle de ce dernier (Fig. 9-B).

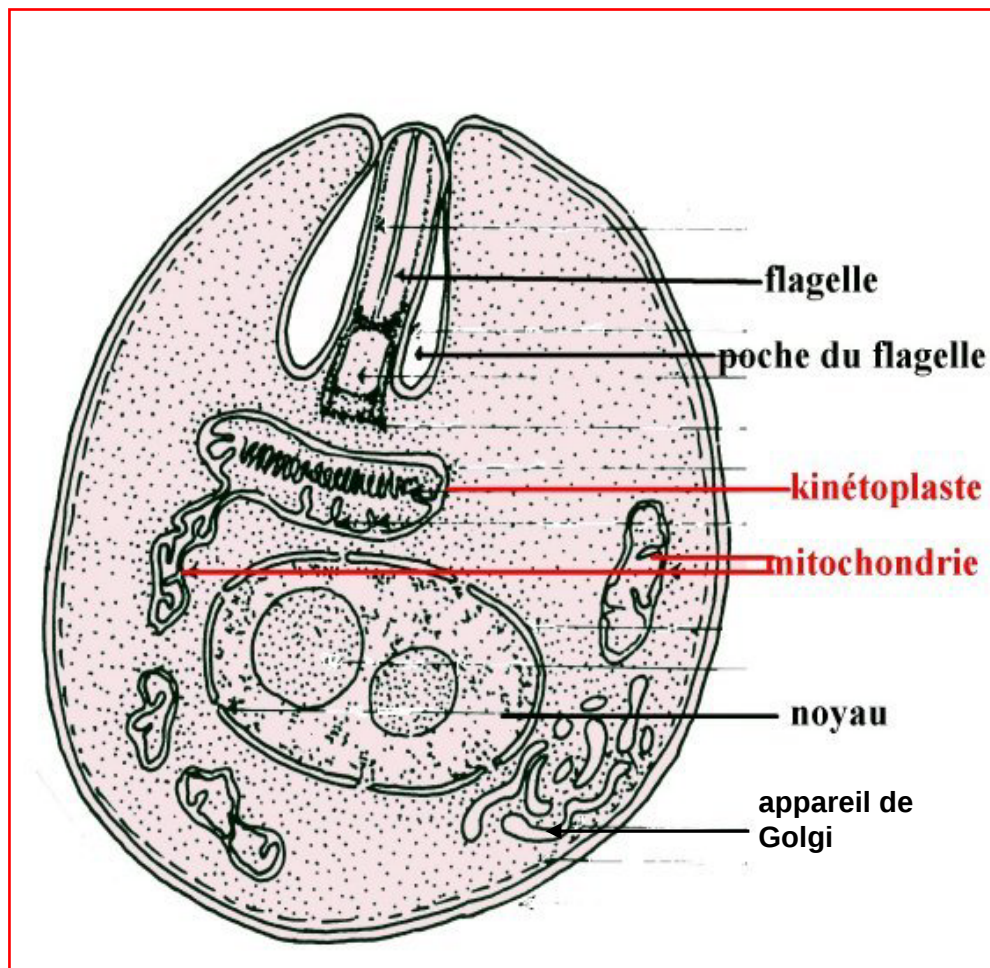


Figure 8 : Ultrastructure d'un amastigote de *Leishmania* sp.

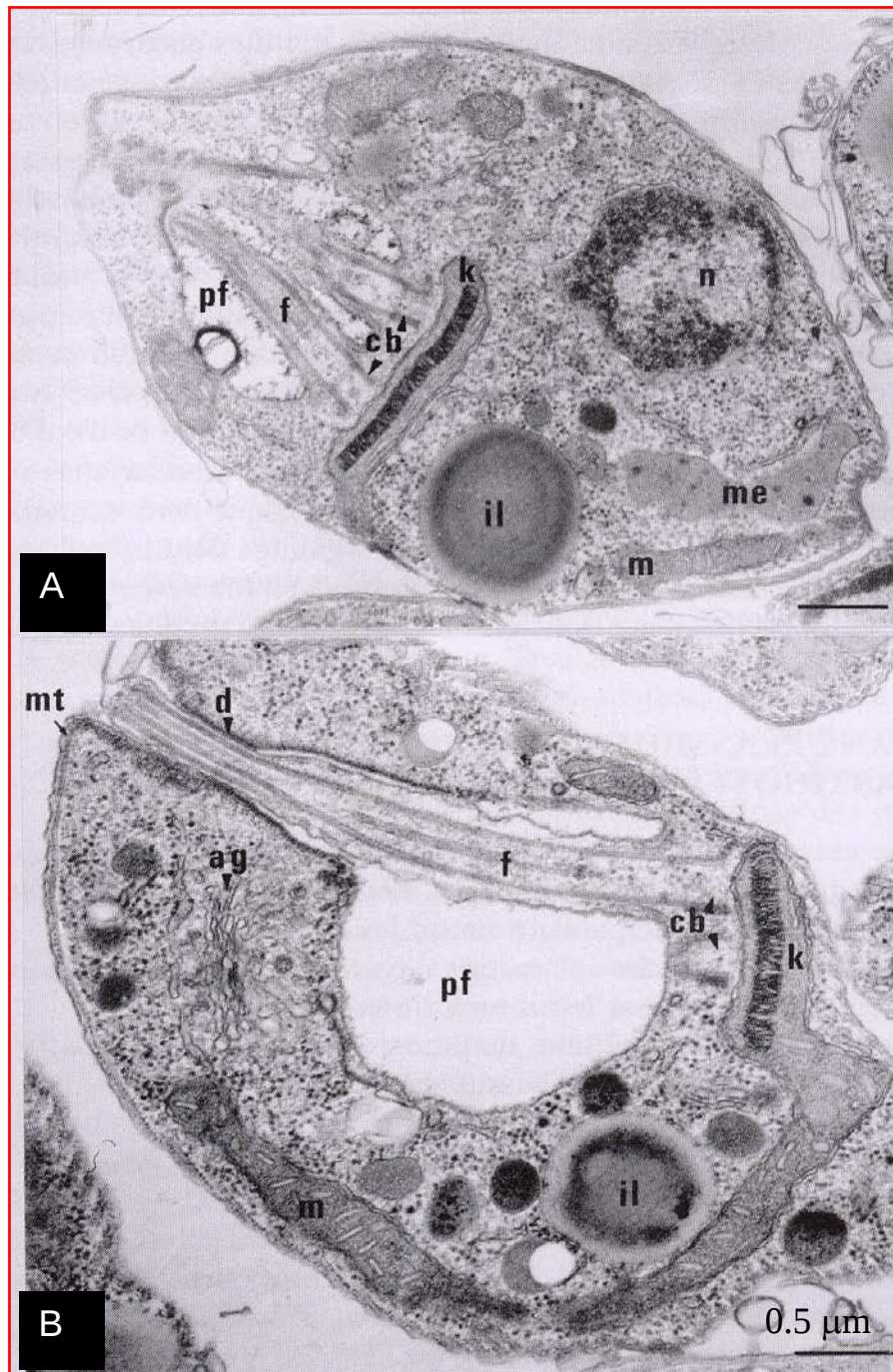


Figure 9 : A et B. Amastigotes de *Leishmania amazonensis* observés par microscopie électronique à transmission. L'amastigote situé en A. est en cours de division comme l'indique la présence des deux flagelles, n: noyau; mt: microtubules corticaux; f: flagelle; cb: corpuscule basal; pf: poche flagellaire; d: desmosome; ag: appareil de Golgi; k: kinétoplaste; m: mitochondrie; me: mégasome; il: inclusion lipidique. Barres.

On note au niveau du pôle antérieur et à proximité des corpuscules basaux la présence d'un organe caractéristique des kinétoplastidés, le kinétoplaste qui représente une portion particulière de l'unique mitochondrie, il contient l'ADN mitochondrial organisé en nombreuses structures circulaires : les mini-cercles et les maxi-cercles. Comme dans toutes les cellules eucaryotes complexes, on a pu aussi identifier, chez *Leishmania*, de nombreux organites bordés par une membrane et qui participent soit à la biosynthèse des constituants parasitaires comme le réticulum endoplasmique rugueux, soit à la dégradation de composants parasitaires ou exogènes (organites de type endosomal ou lysosomal). Il est intéressant de signaler que les compartiments lysosomaux des amastigotes de *Leishmania* appartenant aux complexes *mexicana* et *amazonensis* (*L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. pifanoi*) sont particulièrement développés et leur taille leur a valu le nom de mégasomes. Comme les lysosomes des cellules eucaryotes supérieures, ils ont un contenu acide et riche en hydrolases acides (phosphatases acides, arylsulfatases, cystéine-protéases, métallo-protéases). D'autres structures/organites dont la fonction reste à préciser ont été signalés : des inclusions lipidiques assurant vraisemblablement le stockage d'acides gras et des vacuoles de polyphosphate riche en calcium et en magnésium [Molyneux et al., 1987].

2- Membrane plasmique des promastigotes et des amastigotes.

La membrane plasmique représente la seule interface séparant le cytoplasme des *Leishmania* des divers biotopes colonisés, elle protège donc le parasite contre les agents agressifs rencontrés, assure la capture de métabolites et permet les interactions avec les hôtes qu'il parasite successivement au cours de son cycle et notamment les interactions qu'il établit avec certaines de leurs cellules (liaison avec les cellules épithéliales du tube digestif des diptères, liaison avec les MΦ des mammifères suivie du processus de phagocytose). On distingue dans la membrane plasmique le lipophosphoglycane (LPG), un glycolipide de haut poids moléculaire, et des glycoinositol-phospholipides de faible poids moléculaire (GIPLs) (Tableau 1) [Antoine et al., 1999]. Des glycosphingolipides associés à la membrane plasmique des amastigotes ont été également décrits dans deux espèces de *Leishmania* (*L. donovani*, *L. mexicana*). Curieusement, ils semblent avoir la cellule hôte pour origine. La façon dont ils s'associent avec les parasites et leur fonction restent à préciser.

Il est important de noter qu'au stade promastigote, toutes les espèces de *Leishmania* expriment du LPG en abondance dans leur membrane plasmique. Par contre, au stade amastigote, les *Leishmania* n'expriment pas ce composant (*L. donovani*, *L. mexicana*) ou que très faiblement (*L. major*). Le LPG est une molécule tripartite composée d'un polymère de sous-unités disaccharidiques (galactose- mannose) liées entre elles par des liaisons phosphodiester, d'un noyau hexa- ou heptasaccharidique, d'un groupement lyso-1-alkylphosphatidylinositol qui assure l'ancrage membranaire. Le LPG joue un rôle primordial tant chez les hôtes invertébrés que vertébrés (notamment dans le mécanisme d'échappement au complément). Les GPIs, au contraire sont présents aussi bien dans la membrane plasmique des promastigotes que dans celle des amastigotes. La fonction qu'ils remplissent reste cependant à définir. On suspecte qu'ils jouent un rôle structural et protecteur, ils pourraient ainsi protéger les protéines membranaires du milieu très acide qui baigne les amastigotes [Antoine et al., 1999].

De nombreuses protéines sont également présentes dans la membrane plasmique des *Leishmania* (Tableau 1) ; on distingue des enzymes, des transporteurs, des récepteurs et des protéines structurales, cependant la protéine qui a été la plus étudiée est la glycoprotéine 63 (gp63), encore appelée PSP (promastigote surface protease) ou leishmanolysine.

La gp63 est une métallo-protéase ancrée dans la membrane plasmique des promastigotes par un GPI et dont le domaine catalytique est tourné vers le milieu extracellulaire ; des études récentes montrent qu'il s'agit en fait d'une famille de protéines très voisines codées par 6 à 11 gènes différents organisés en 1 à 3 groupes selon l'espèce de *Leishmania*. Des protéases appartenant à cette famille ont été détectées à la surface de deux trypanosomatidés monogénétiques ne parasitant que des insectes, à savoir *Crithidia fasciculata* et *Herpetomonas samuelpessoai*, ce qui donne à penser que dans *Leishmania*, un des rôles majeurs des gp63 se joue dans l'hôte invertébré. Ces protéases pourraient par exemple assurer la dégradation de molécules toxiques pour les parasites ou bien la production de métabolites (protéolyse de l'hémoglobine). Cette hypothèse est étayée par le fait que l'expression des gp63 est très dépendante du cycle : Très abondantes dans la membrane plasmique des promastigotes, elles disparaissent presque complètement, voire totalement, de cette structure au stade

amastigote. Cependant, il n'est pas exclu que ces protéines membranaires jouent un rôle important chez les mammifères pendant les toutes premières phases de l'infection (notamment dans les mécanismes d'échappement au complément, la liaison puis la phagocytose des promastigotes par les MΦ). D'autres protéines membranaires dont l'expression est régulée au cours du cycle sont actuellement en cours d'étude, leur rôle reste à être défini.

Tableau 1. représente la composition de la membrane plasmique des promastigotes et des amastigotes. [Antoine et al., 1999].

Promastigotes		amastigotes	
Molécules	Espèce de <i>leishmania</i> analysée	Molécules	Espèce de <i>leishmania</i> analysée
LPG	Ld, Lme, Lma	LPG	Ld, Lme, Lma
GIPLs	Ld, Lma	GIPLs	Ld, Lma
gp 63	Ld, Li, Lme, Lam, Lp, Lma, La, Lt, Lga, Lb, Lgu, Lpa, Le	gp 63	Ld, Lma, Lme
Protéine B	Lma	Protéine B	Lma
Protéine KMP-11	Ld, Li, Lme, Lam, Lma, La, Lt, Lb, Lpa	Protéine KMP-11	?
Protéine M-2/PSA-2	Ld, Lme, Lma, Lam	Protéine M-2/PSA-2	Lma
ATPase H ⁺	Ld, Lme, Lb	ATPase H ⁺	Ld
ATPase Ca ²⁺	Ld, Lme, Lb	ATPase Ca ²⁺	?
Phosphatase acide	Ld, Lam, Lme	Phosphatase acide	Lme
3'-nucléotidase/nucléase	Ld	3'-nucléotidase/nucléase	Lme
5'-nucléotidase	Ld	5'-nucléotidase	Lme
Protéine kinase LPK	Ld, Lma	Protéine kinase LPK	
Transporteurs de glucose	Ld, Le	Transporteurs de glucose	?
Transporteurs de proline	Ld	Transporteurs de proline	Ld
Transporteurs de transferrine	Li, Lma	Transporteurs de transferrine	Ld

- Abréviations : Ld : *L. donovani* ; Li : *L. infantum* ; Lc : *L. chagasi* ; Lme : *L. mexicana* ; Lam : *L. amazonensis* ; Lp : *L. pifanoi* ; Lma : *L. major* ; La : *L. aethiopica* ; Lt : *L. tropica* ; Lga : *L. granhami* ; Lb : *L. braziliensis* ; Lgu : *L. guyensis* ; Lpa : *L. panamensis* ; Le : *L. enriettii*.

B) Croissance et migration des *Leishmania* dans le tube digestif des phlébotomes.

Au moment d'un repas sanguin sur des mammifères infectés par *Leishmania* que les phlébotomes femelles (fig. 10) sont contaminés par ces parasites. Cette contamination de l'hôte vecteur ne va cependant pas toujours aboutir à son infection, ou à tout le moins ne va pas nécessairement aboutir à la formation de promastigotes infectieux pour les mammifères. Les interactions hôtes invertébrés-*Leishmania* qui régissent le développement de stades parasitaires infectieux sont le plus souvent très spécifiques, chaque espèce de *Leishmania* étant inféodée à une seule ou à quelques espèces seulement de phlébotomes [Walters et al., 1993 ; Antoine et al., 1999].



Figure 10 : Phlébotome femelle (*Phlebotomus papatasi*) s'abreuvant de sang.

Après l'ingestion du sang par les diptères, celui-ci coagule très rapidement dans leur intestin médian abdominal. Vingt-quatre heures sont nécessaires pour qu'il soit circonscrit par une membrane dite péritrophique synthétisée par les cellules épithéliales du tube digestif et composée de chitine et de glycoprotéines. C'est dans ce bol alimentaire que les amastigotes ingérés se différencient en promastigotes. Ceux-ci se divisent activement tout d'abord sous une forme trapue dite procyclique (24 à 48 heures après l'infection) puis ils vont se transformer en formes très fuselées, se divisant également activement et connues sous le nom de nectomonades. Vers le 3 jour, la membrane péritrophique commence à se fragmenter et les résidus du repas sanguin sont déjà partiellement excrétés de l'intestin médian. Les nectomonades qui s'échappent de l'enveloppe défectueuse vont alors se fixer via leur flagelle sur les microvillosités de l'intestin médian abdominal et il est vraisemblable que cette liaison évite leur élimination lors du transit intestinal. Après 4 à 5 jours, on assiste à une migration des nectomonades vers l'intestin médian thoracique.

À ce stade, deux voies de différenciation semblent empruntées :

- Certains nectomonades se transforment en promastigotes dits métacycliques, très infectieux pour les hôtes mammaliens. Les promastigotes métacycliques ne sont plus capables de se diviser, ils présentent un corps cellulaire très fuselé mais relativement court et un très long flagelle. Ils sont doués par ailleurs d'une très grande motilité et vont s'accumuler entre 7 et 10 jours après l'infection au niveau de la valve stomodéale qui sépare le tube digestif médian du tube digestif antérieur.
- D'autres nectomonades se transforment en promastigotes ovalaires, lesquels donnent vraisemblablement naissance aux paramastigotes.

La différenciation des nectomonades en promastigotes métacycliques s'accompagne de la migration des parasites vers les parties antérieures du tube digestif des diptères, un événement nécessaire à leur transmission aux hôtes mammaliens lors de la prise d'un repas sanguin ultérieur (voir Fig. 6).

Il est maintenant clair que l'expression du LPG et des variations structurales de cette molécule sont, au moins en partie, à l'origine des localisations successives occupées par les parasites dans l'intestin des diptères. Des composants de la membrane plasmique autres que le LPG sont suspectés de participer à la liaison des parasites sur les microvillosités du tube digestif des phlébotomes car le LPG est exprimé sur toute la surface de la membrane plasmique, alors que les parasites ne sont liés que par leur flagelle. Les protéines qui sont à l'origine de cette liaison polarisée ne sont pas encore identifiées.

C) Vie des *Leishmania* dans leurs hôtes mammaliens.

1- Premier contact des promastigotes avec l'hôte mammalien.

Lors du repas sanguin, 10 à 100 promastigotes métacycliques sont injectés dans le derme du mammifère conjointement à de la salive (la salive est décrite comme contenant des substances favorisant l'établissement de l'infection). La salive agirait notamment sur les MΦ (cellules hôtes des *Leishmania* dans les mammifères) et

les rendrait réfractaires à l'action de certaines cytokines activatrices normalement capables d'amplifier/de déclencher leurs mécanismes microbicides (production d'eau oxygénée, de monoxyde d'azote). Elle pourrait également diminuer la capacité qu'ont les MΦ à présenter des antigènes aux lymphocytes T et moduler ainsi la réponse immunitaire de l'hôte. Une partie des effets immunomodulateurs de la salive semble être due à un peptide, le maxadilan, qui, par ailleurs, possède des propriétés vasodilatatrices [Antoine et al., 1999].

Dès leur injection dans le derme des mammifères, les promastigotes vont devoir faire face à la première barrière anti-infectieuse, à savoir la cascade du complément qui peut être activée selon deux voies dites classique et alterne. Selon l'espèce de *Leishmania* et le stade parasitaire, l'une ou/et l'autre voie(s) est (sont) enclenchée(s). Ces deux voies convergent aux étapes de fixation du composant C3 sur la membrane plasmique des parasites et de son clivage en C3b. Plusieurs molécules de la membrane plasmique peuvent lier le C3b, parmi lesquelles on a identifié le LPG et la gp63. A ce stade, deux possibilités sont offertes : Le C3b initie la formation du complexe lytique C5b-9 ou bien une protéolyse du C3b en C3bi stoppe la cascade enzymatique. Les *Leishmania* et notamment les promastigotes métacycliques, sont équipés de nombreux mécanismes qui conduisent au blocage de l'activation du complément ou bien permettent de résister aux complexes lytiques formés (mécanismes d'échappement au complément).

Ceci donne à penser que ce stade parasitaire est préadapté aux conditions rencontrées dans les mammifères. Ainsi, la gp63 qui, dans certaines espèces de *Leishmania*, est plus abondamment exprimée au stade métacyclique qu'aux autres stades parasitaires, permettrait la conversion du C3b en C3bi. D'autre part, la phosphorylation des molécules C3 et C3b par des protéine-kinases situées sur la face externe de la membrane plasmique des promastigotes de *L. major* et de *L. donovani* a été décrite. De cette modification pourrait résulter une activation abortive du complément.

Il a été également rapporté l'existence d'une résistance au complément pour les promastigotes métacycliques de *L. major* qui peuvent activer efficacement la cascade sans que cela se traduise par une lyse cellulaire. Cette propriété serait due d'une part au largage rapide des complexes lytiques C5b- 9 dans le milieu extracellulaire et à

des modifications structurales du LPG qui, au stade métacyclique, atteint une taille telle qu'il bloque l'accès des complexes C5b-9 à la membrane plasmique.

2- L'adhésion des promastigotes aux MΦ et leurs internalisation.

Les promastigotes qui échappent à l'action délétère du complément vont se fixer sur les MΦ dermiques, lesquels vont les englober rapidement et les détruire ou leur servir de refuge, l'issue de cette interaction est dépendante à la fois du stade parasitaire et de l'état des MΦ [Alexander et al., 1992 ; Antoine et al., 1999].

Si dans un premier temps, seuls les MΦ dermiques résidents sont infectés, d'autres monocytes/ MΦ recrutés au niveau du site infectieux vont être progressivement envahis par les parasites. Des données récentes suggèrent que des monocytes récemment recrutés pourraient également servir de cellules hôtes initiales. Il peut sembler a priori paradoxal d'élire les MΦ comme cellules hôtes car ces cellules sont équipées de mécanismes microbicides qui sont délétères pour la plupart des micro-organismes.

les *Leishmania* ont cependant développé des stratégies pour déjouer ces mécanismes ou leur résister.

La plupart des auteurs s'accordent à dire que la liaison des promastigotes sur les MΦ ne présente pas de polarité et que les parasites peuvent se fixer via leur flagelle ou via le corps cellulaire. L'interaction primaire des promastigotes et des MΦ semble donc passive et repose sur la reconnaissance par divers récepteurs présents sur la membrane plasmique des macrophages de ligands endogènes ou exogènes situés sur la face externe des promastigotes (Fig. 11) (Tableau 2) [Antoine et al., 1997]. Ainsi, des récepteurs de type lectine peuvent se lier sur diverses molécules intrinsèques de la membrane plasmique des parasites comme le LPG et la gp63. Il est à noter également que, dans les conditions physiologiques, c'est-à-dire en présence de facteurs sériques, les promastigotes fixent des quantités notables de C3b et de C3bi de manière covalente et de nombreux travaux favorisent l'idée que ces composants du complément jouent un rôle majeur dans l'interaction des promastigotes avec les MΦ via respectivement les récepteurs CR1 et CR3 (Fig. 12) (Tableau 2).

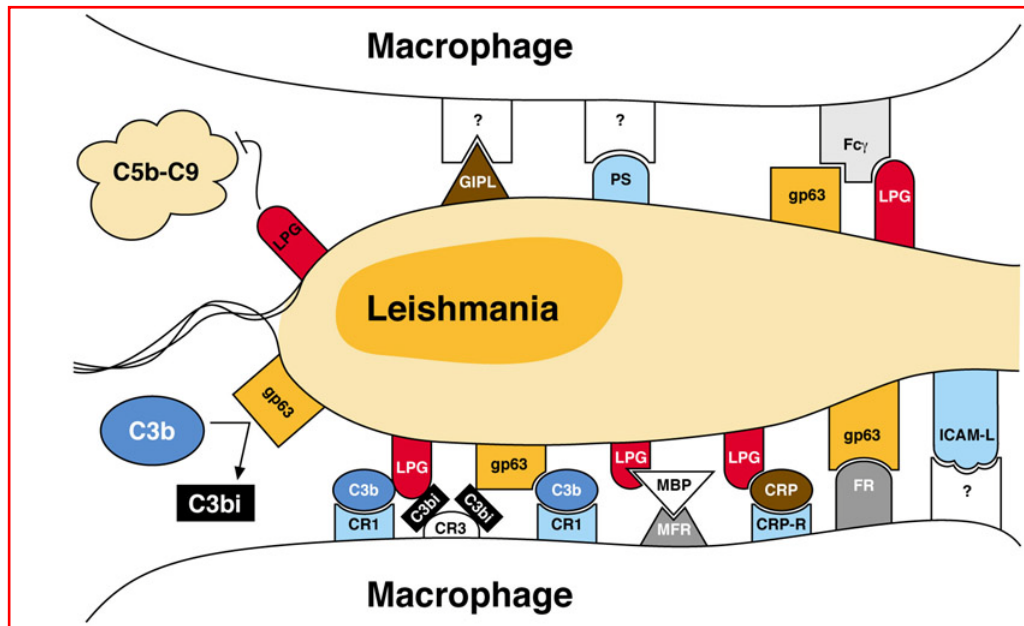


Figure 11 : Interaction MΦ et *Leishmania* via des molécules de surface et des protéines solubles.

PS= phosphatidylsérine, MBP= mannose binding protein, MFR= mannose fucose receptor, CRP= C-reactive protein, CRP-R= C-reactive protein receptor, FR= fibronectine receptor.

L'utilisation préférentielle de ces récepteurs que l'on dit "permissifs" assurerait l'établissement de la parasitose car ils sont peu enclins à activer un mécanisme leishmanicide précoce des MΦ, à savoir la flambée oxydative dont la mise en œuvre est dépendante d'un complexe multi-enzymatique connu sous le nom de NADPH oxydase. Ce processus génère des dérivés de l'oxygène très réactifs tels l'anion superoxyde O_2^- , l'eau oxygénée H_2O_2 , le radical hydroxyle $OH^\bullet$ et l'oxygène singulet 1O_2 dérivés qui sont toxiques pour les *Leishmanies* et plus particulièrement pour les promastigotes. Cette stratégie de survie a été bien documentée pour l'espèce *L. major*. Il n'est pas exclu cependant que des récepteurs "permissifs" différents du CR1 et du CR3 soient utilisés par d'autres espèces. L'absence ou la faible production de dérivés actifs de l'oxygène par les MΦ mis en contact avec des promastigotes pourrait également être l'œuvre de molécules parasitaires sélectionnées pour bloquer la synthèse de ces molécules toxiques. Ainsi, le LPG synthétisé par les promastigotes est capable d'inhiber certains signaux de transduction (Fig. 13) mettant en jeu une (les) protéine-kinase(s) C des MΦ et notamment ceux impliqués dans la flambée oxydative (*L. donovani*). Une action directe du LPG sur une (les) protéine-kinase(s) C et une chélation du Ca^{++} par cette même

molécule pourraient rendre compte de l'inhibition observée. D'autres molécules parasitaires pourraient interférer avec la transduction de signaux dans les MΦ [Turco et al., 1992 ; Alexander ; Antoine et al., 1999].

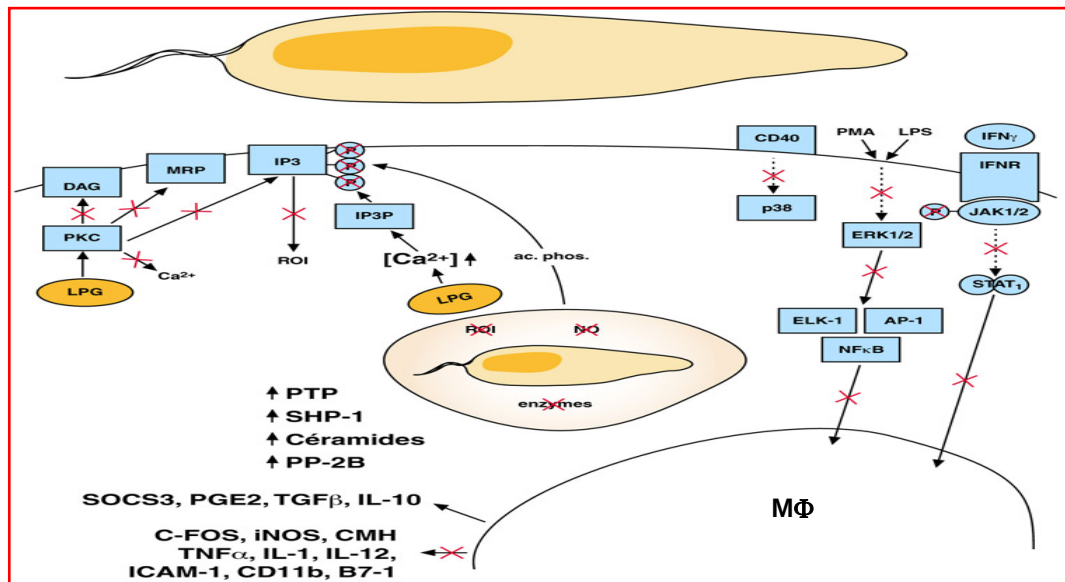


Figure 12 : Répercussions de l'infection par *Leishmania* sur les cascades signalétiques et la transcription de gènes chez le MΦ.

Ainsi, une action inhibitrice des GIPLs sur les protéine-kinases C a été mentionnée et une phosphatase acide membranaire extraite de promastigotes de *L. donovani* a la capacité d'inhiber la flambée oxydative [Turco et al., 1992] [Antoine et al., 1999].

D'autres *Leishmania* semblent avoir développé une résistance vis-à-vis de ce mécanisme (*L. mexicana*) et le LPG, là aussi, paraît être impliqué puisqu'il a été décrit comme un inactivateur de métabolites toxiques de l'oxygène (radical hydroxyle, anion superoxyde). Ainsi, le LPG apparaît comme une molécule clé dont les nombreuses propriétés contribuent à l'établissement d'un parasitisme durable et la font considérer comme un facteur de virulence important. Cette idée est confortée par le fait qu'on constate que les promastigotes incapables de synthétiser du LPG (mutants par exemple) sont rapidement détruits par les MΦ après leur intemalisation. D'autre part, la

simple pré- incubation de promastigotes dépourvus de LPG avec du LPG exogène suffit à prolonger leur survie dans les MΦ. Il est à noter également que GIPLs et LPG de *L. major* sont aussi capables d'inhiber la production du monoxyde d'azote NO, un composé leishmanicide synthétisé par les MΦ activés, à condition toutefois d'être incubés avec les MΦ avant que ceux-ci soient soumis à l'agent activateur [Chang et al., 1990].

C'est par un processus de phagocytose que les MΦ vont ensuite internaliser les promastigotes liés. Elle est initiée par l'engagement, dans la liaison, de certains récepteurs tels que le CR1, le CR3, les récepteurs Fc, le récepteur mannose. Ceux-ci vont émettre des signaux qui impliquent notamment la phosphatidylinositol 3-kinase et la phospholipase C et qui aboutissent au recrutement sous-membranaire de molécules amorçant la polymérisation de lactine. Cette restructuration locale du cytosquelette va permettre la progression de pseudopodes autour des parasites qui vont alors être progressivement englobés par les cellules hôtes. Lorsque le processus d'internalisation est achevé, les parasites se retrouvent en position intracellulaire à l'intérieur d'une vacuole que l'on nomme phagosome et qui, dans un premier temps, est bordée par une membrane ayant pour origine la membrane plasmique du MΦ. Il n'est pas exclu cependant que certaines protéines de la membrane plasmique du macrophage soient éliminées du phagosome naissant et que d'autres s'y concentrent, notamment celles impliquées dans la liaison des parasites.

Tableau 2. représente les récepteurs et ligands impliqués dans la liaison et la phagocytose des *leishmania* par les MΦ.[Antoine et al., 1997].

Stade parasitaire	Récepteurs présents sur la membrane plasmique des MΦ	Ligands présents sur/dans la membrane plasmique des parasites	Espèce de <i>Leishmania</i> analysée
Promastigotes	Récepteur du mannose/fucose	LPG, gp 63	Ld
	CR3 (CD11b/CD18, Mac-1)	LPG, gp 63	Lma
	CR1, CR3, P150, P95 (récepteur de la fibronectine)	Composants C3b et C3bi du complément	Ld, Lme, Lma, Lam
	Récepteur(s) Fc _γ	IgG	Lb
Amastigotes	Récepteur du mannose/fucose	?	Lma
	CR3 (CD11b/CD18, Mac-1)	Composants C3	Lma
	Récepteur(s) Fc _γ	IgG	Lma

- Abréviations: Ld: *L. donovani* ; Lme : *L. mexicana* ; Lam : *L. amazonensis* ; Lma : *L. major* ;Lb : *L. braziliensis*.

D) Formation de la VP et différenciation des promastigotes en amastigotes.

Suite à la phagocytose des promastigotes, les phagosomes néo-formés vont migrer vers le centre cellulaire, au cours de cette période migratoire qui ne va prendre que quelques minutes, le compartiment abritant les parasites va déjà subir des modifications, lesquelles vont se poursuivre pendant les heures suivantes et aboutir à la formation d'organites connus sous le terme générique de vacuoles parasitophores (VP). Celles-ci adoptent des morphologies très différentes selon l'espèce de *Leishmania* qu'elles hébergent [Antoine et al., 1998]. Ainsi, la plupart des *Leishmania* vivent dans des vacuoles individuelles de petite taille et dont la membrane épouse assez étroitement la forme du parasite. Dans ces cas, chaque MΦ infecté peut contenir de très nombreuses VP. Par contre, la souche qu'on étudie à savoir *L. amazonensis* vit dans des VP de très grande taille, communautaires, chacune pouvant héberger des dizaines de parasites. Dans ce cas, les MΦ infectés ne contiennent que peu de VP, voire qu'une seule.

Il est à noter que dans le cas d'infection par *L. mexicana*, les MΦ infectés présentent un profil intermédiaire puisque l'on y distingue de grandes VP abritant plusieurs parasites et de nombreuses petites VP individuelles. Ce sont très certainement les capacités de fusion des VP entre elles et avec d'autres compartiments de la cellule hôte qui déterminent ces morphotypes.

Si la taille des VP est fortement déterminée par l'espèce de *Leishmania* abritée, il n'est pas exclu cependant que, dans une moindre mesure, le type de MΦ hôte et leur état d'activation influent sur la morphologie des VP.

Les parasites ne restent pas libres dans les VP mais vont s'associer à la membrane de ces organites via leur pôle postérieur opposé à la poche flagellaire (Fig. 14) [Antoine et al., 1999]. La jonction est très étroite puisque l'espace séparant la membrane des parasites de la membrane des VP ne dépasse pas 2nm. La nature de la liaison et les molécules impliquées restent à préciser mais la présence de particules intramembranaires agrégées dans la membrane plasmique parasitaire suggère l'existence d'une spécialisation de cet organite à ce niveau.

A l'intérieur des VP, les promastigotes vont se différencier en amastigotes mieux adaptés à la vie intracellulaire. Le temps nécessaire à cette transformation semble variable selon les *Leishmania* même pour des espèces phylogénétiquement très proches. Par exemple, l'achèvement de ce processus requiert 5 à 7 jours pour *L. amazonensis*, alors que pour *L. mexicana*, 3 à 4 jours semblent suffisants. Au cours de cette différenciation, on note une perte progressive du flagelle liée à une diminution de la synthèse des tubulines α et β , l'adoption graduelle d'un corps ovoïde et l'apparition des mégasomes chez *L. amazonensis* et *L. mexicana*. Ces modifications morphologiques s'accompagnent de la diminution voire de la perte de l'expression de certains gènes et de l'activation d'autres gènes. Ainsi, au niveau de la membrane plasmique, le LPG va disparaître (*L. donovani*, *L. mexicana*) ou ne va plus être exprimé qu'à un très faible niveau et sous une forme différente de celles exprimées par les promastigotes (*L. major*). Les gp63 associées à la membrane plasmique par une ancre de type GPI ne vont plus être exprimées (*L. major*) ou que très faiblement (*L. mexicana*). Si certaines

fonctions de la membrane plasmique, telles que le maintien du gradient électrochimique d'ions H^+ et le transport de la proline, sont toujours assurées au stade amastigote, elles le sont par des polypeptides au moins en partie différents [Antoine et al., 1998].

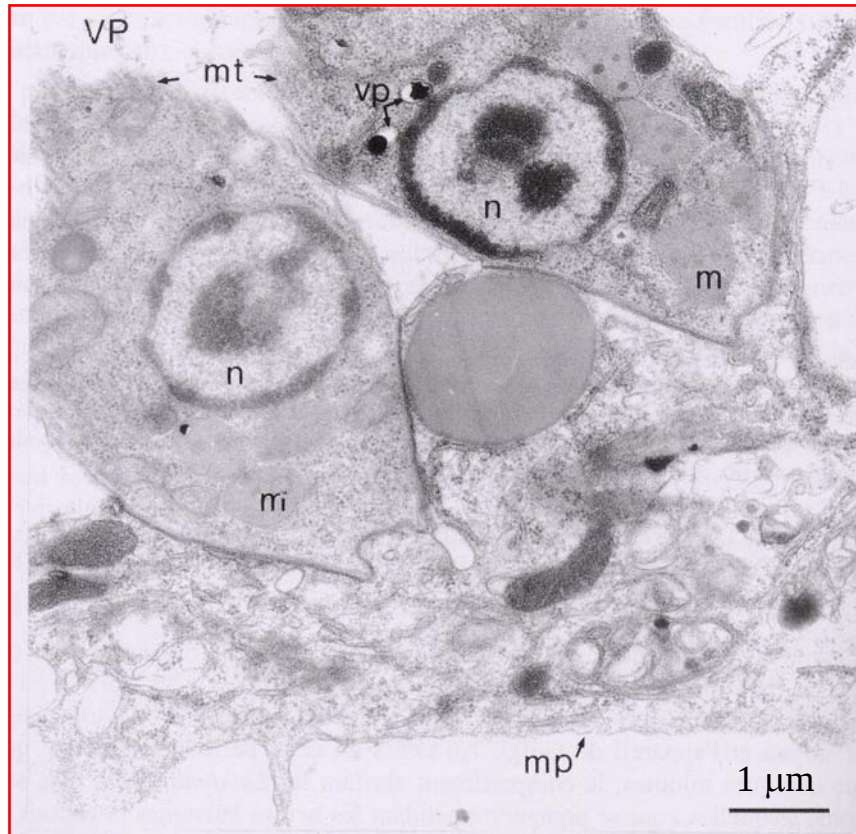


Figure 13. Observation par microscopie électronique à transmission des sites d'attachement d'amastigotes de *Leishmania amazonensis* sur la membrane des VP d'un MΦ de souris infecté. n: noyau des parasites; m: mégasomes; mt: microtubules corticaux observés tangentiellement; vp: vacuoles de polyphosphate; VP: lumière de la vacuole parasitophore; mp: membrane plasmique du MΦ.

On peut à ce stade se poser la question : Quelles modifications vont subir les phagosomes néo-formés abritant les parasites et quelle est la nature des VP matures ? . L'étude de la formation de ces compartiments est encore très fragmentaire.

Tout d'abord, il n'y a eu que très peu de travaux portant sur les étapes précoces qui suivent l'internalisation des parasites. D'autre part, dans beaucoup d'études ayant trait à l'analyse des VP, les amastigotes ont été utilisés comme agents infectieux plutôt que les

promastigotes. Si l'on se rapporte à ce qui a été décrit dans la littérature concernant les phagosomes abritant d'autres particules, on peut raisonnablement proposer que dans les minutes qui suivent la capture des parasites, le phagosome est le siège d'un remodelage intensif qui va aboutir à un recyclage de certaines protéines de la membrane plasmique internalisées vers leur site d'origine.

Cette restructuration semble résulter d'échanges latéraux avec les endosomes précoces et d'un bourgeonnement de vésicules à partir des phagosomes. Le pH intravacuolaire va diminuer très rapidement et atteindre 5,5 unités, 30 minutes à peine après l'infection. Le pH va décroître encore dans les heures suivantes mais beaucoup plus lentement. Cette acidification phagosomale est un processus actif qui pourrait être dû, au moins en partie, à la libération de protons par les parasites car, comme nous l'avons vu ci-dessus, les *Leishmania* sont équipées d'une ATPase membranaire qui rejette les protons de leur cytosol vers le milieu extracellulaire, en l'occurrence la lumière phagosomale. Mais la cause majeure de l'acidification vacuolaire résulte très certainement de la présence, dans la membrane phagosomale, d'une ATPase membranaire dite de type V (pour vésiculaire) qui assure le transfert de protons présents dans le cytosol des macrophages vers la lumière de la VP naissante. La façon dont cette V-ATPase atteint les VP n'est pas claire. Plusieurs hypothèses non exclusives peuvent être proposées. Présente sur la membrane plasmique, elle pourrait être trappée lors de la phagocytose. Mais étant principalement exprimée dans les divers compartiments de la voie d'endocytose (vésicules recouvertes de clathrine, endosomes, lysosomes) et dans quelques compartiments de la voie biosynthétique (appareil de Golgi, granules de sécrétion), il est vraisemblable que sa présence dans les phagosomes résulte d'interactions que ces derniers établissent avec les endosomes/lysosomes et des vésicules issues de l'appareil de Golgi.

La fusion des phagosomes abritant des *Leishmania* avec les compartiments tardifs de la voie d'endocytose (prélysosomes, lysosomes) a été amplement documentée. Elle est si importante dans le cas des phagosomes abritant *L. amazonensis* que cela va aboutir à une déplétion progressive dans la cellule hôte des compartiments d'endocytose tardifs. La V-ATPase pourrait d'ailleurs intervenir dans ce processus car la bafilomycine A1, un inhibiteur très sélectif de cette enzyme, diminue fortement la

formation des grandes VP abritant *L. amazonensis*. De manière générale, la fusion avec les compartiments d'endocytose tardifs va se traduire par de nouvelles modifications des VP qui, à terme, vont présenter les caractéristiques de prélysosomes/lysosomes tant au niveau membranaire qu'au niveau de leur contenu et ceci, indépendamment de *Leishmania* abritée (*L. donovani*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*) et de la taille, petite ou grande, qu'elles vont atteindre. Des études de la cinétique d'apparition de composants lysosomaux dans les VP montrent une acquisition rapide de glycoprotéines lysosomales membranaires. Ainsi, 1 à 2 h après l'infection, la membrane des VP est déjà riche en glycoprotéine lysosomale LAMP- 1 et en macrosialine, une glycoprotéine lysosomale spécifique des MΦ appartenant à la famille des LAMPs mais qui possède aussi des caractéristiques en commun avec les mucines [Lang et al., 1994 ; Courret et al. 2002].

Vingt quatre à 48 h après l'infection, la membrane des VP contient diverses glycoprotéines lysosomales et présente, sur sa face externe, une accumulation de protéine rab7p, une GTPase de petit poids moléculaire impliquée dans la régulation du trafic vésiculaire reliant divers compartiments d'endocytose tardifs (Tableau 3) [Antoine et al., 1999]. A ce stade, le contenu des VP est toujours très acide (pH 4,5 à 5,5) et riche en enzymes lysosomales fonctionnelles. Il a même été montré dans une combinaison *Leishmania*-cellule hôte que l'infection des macrophages entraînait une augmentation de l'activité et/ou de la quantité de diverses enzymes lysosomales. La présence de molécules parasitaires dans la membrane ou la lumière des VP n'a été que très peu documentée. De plus, seules quelques-unes d'entre elles ont jusqu'à présent été caractérisées. Par exemple, une phosphatase acide sécrétée dans la lumière des VP par des amastigotes de *L. donovani* a été décrite. La présence d'un protéophosphoglycane de haut poids moléculaire dans les VP abritant des amastigotes de *L. mexicana* a été également rapportée. Le rôle joué par ces molécules dans les interactions parasite- MΦ reste à déterminer [Courret et al., 2002].

En se basant sur la composition des VP, les VP sont donc considérées comme des phagolysosomes. Cette conclusion est confortée par le fait que les VP se comportent fonctionnellement comme des compartiments d'endocytose tardifs, ainsi elles accumulent notamment des substances présentes dans les phases fluides extracellulaires et des molécules se liant à certains récepteurs présents dans la membrane plasmique des

MΦ (comme le récepteur mannose/fucose). Les substances ainsi internalisées doivent très certainement être utilisées comme source de métabolites pour les *Leishmania*, après leur dégradation par les macrophages ou par les parasites eux-mêmes [Antoine et al., 1999].

Tableau 3. représente les différents constituants de la VP. [Lang et al., 1994 ; Antoine et al., 1997 ; Courret et al., 2002].

Protéines synthétisées par les MΦ	Espèce de <i>Leishmania</i> analysée
Rap7 (GTPase spécifique des endosomes tardifs/prélysosomes)	Ld, Lam
Lamp-1, Lamp-2 (glycoprotéines lysosomales)	Ld, Lam, Lme
Macrosialine (glycoprotéine prélysosomale spécifique des MΦ)	Ld, Lam
Molécules de classe II codées par le CMH	Ld, Lam, Lme, Lma
Molécules H2-M codées par le CMH	Ld, Lam, Lme
Protéines synthétisées par les parasites	Espèce de <i>Leishmania</i> analysée
Ag non identifiés détectés à l'aide d'Ac spécifiques de groupements carbohydrates	Lme

- Abréviations: Ld: *L. donovani* ; Lme : *L. mexicana* ; Lam : *L. amazonensis* ; Lma : *L. major* ; Lb : *L. braziliensis*.

Parmi les nombreuses molécules présentes dans la membrane des VP, une attention particulière sera accordée aux molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Celles-ci sont des récepteurs et des transporteurs de peptides qui assurent la présentation d'antigènes aux lymphocytes T CD4⁺. Elles sont chargées notamment de capturer des peptides présents dans des compartiments d'endocytose et issus de la dégradation de protéines exogènes internalisées. Composées de deux chaînes α et β synthétisées dans le réticulum endoplasmique rugueux, elles s'associent précocement mais de manière transitoire avec une troisième chaîne dite invariante non codée par le CMH. Le complexe ainsi formé va suivre la voie biosynthétique puis atteindre des compartiments tardifs de la voie d'endocytose par un cheminement qui reste à préciser. La chaîne invariante serait dégradée à ce niveau, ce qui libérerait le site de liaison des peptides des molécules de classe II. Les complexes classe II-peptide formés seraient ensuite expédiés vers la surface cellulaire. Des vésicules connues sous le nom de MIIC et dans lesquelles s'accumuleraient les

molécules de classe II néosynthétisées pour se charger en peptides ont été caractérisées. Leur existence en tant qu'organites distincts des lysosomes et spécifiques des cellules présentatrices d'antigènes (lymphocytes B, cellules dendritiques, MΦ) fait cependant l'objet d'un débat [Lang et al., 1994, 2000].

Une distribution très particulière des molécules de classe II est observée dans les VP de MΦ de souris abritant *L. amazonensis*, à savoir une polarisation très prononcée au niveau des sites d'attachement des parasites sur la membrane de ces organites [Antoine et al., 1999]. Il n'a pas encore été précisé si cette distribution reflète une liaison des molécules de classe II avec des composants de la membrane plasmique parasitaire, mais on peut toutefois souligner le fait qu'elle a été observée dans des macrophages de souris d'haplotypes H et H-2. Un tel phénomène est également noté dans les VP de MΦ de souris abritant *L. donovani* et *L. mexicana*.

Le devenir des molécules de classe II associées aux VP reste à étudier. Sont-elles impliquées dans la présentation d'antigènes parasitaires aux lymphocytes T CD4⁺ et donc capables d'atteindre la membrane plasmique des MΦ infectés ? ou bien sont-elles séquestrées dans ces organites ?.

Dans les combinaisons MΦ de souris -*L. amazonensis* et MΦ de souris- *L. mexicana*, on peut montrer qu'une partie des molécules de classes II présentes dans les VP est internalisée par les parasites et se concentre dans leurs mégasomes. La quantité de molécules de classes II associées à ces organites peut être augmentée si l'on traite les MΦ infectés avec certains inhibiteurs de protéases ou bien si l'on incube les parasites avec ces mêmes inhibiteurs avant l'infection, ce qui suggère que les molécules de classe II captées par les parasites sont dégradées par des protéases parasitaires. Les éventuels retentissements de ce phénomène sur la capacité des MΦ infectés à présenter des antigènes parasitaires n'ont pas encore été évalués.

D'autre part, les molécules impliquées étant extrêmement polymorphiques même au sein d'une espèce, il serait souhaitable, afin d'élucider le rôle de ce processus,

d'examiner ce qu'il advient chez des souris d'haplotypes variés et chez des mammifères permissifs et non permissifs à *L. amazonensis*/*L. mexicana* et notamment chez des hôtes naturels.

Une autre molécule codée par le CMH a été récemment découverte dans la membrane des VP abritant *L. amazonensis*, *L. mexicana* ou *L. donovani*. Il s'agit de l'hétérodimère H2-M dont la structure est similaire à celle des molécules de classe II et l'expression dans les MΦ de souris en culture dépendante d'une activation par l'IFN-γ. Son rôle n'est pas encore parfaitement élucidé mais il est vraisemblable qu'il facilite la dissociation des fragments de chaîne invariante encore liés aux molécules de classe II qui atteignent les compartiments d'endocytose et, par voie de conséquence, la fixation de peptides exogènes sur celles-ci. La distribution de H2-M dans les VP de MΦ de souris infectés est identique à celle des molécules de classe II et donc le plus souvent restreinte aux sites de fixation des parasites sur la membrane de ces organites. Une internalisation de H2-M par les amastigotes de *L. amazonensis* a été également documentée. Comme celle des molécules de classe II, l'endocytose de H2-M par les parasites pourrait théoriquement diminuer la capacité des MΦ à présenter des antigènes [Antoine et al., 1999 ; Lang et al., 1994, 2000].

De par leur pH acide et de par la présence de protéases, de molécules de classe II et de molécules accessoires facilitant le chargement des peptides sur les classes II, les VP constituent donc des sites potentiels pour l'apprêtement d'antigènes parasitaires et pour la formation de complexes entre molécules de classe II et peptides parasitaires.

La distribution des molécules de classe II et les molécules accessoires dans les MΦ et les leucocytes dendritiques est étudiée dans la deuxième de ce mémoire.

E) L'adaptation des amastigotes et leur survie dans les phagolysosomes.

Contrairement à la plupart des micro-organismes pathogènes à développement intracellulaire qui ont sélectionné des mécanismes très sophistiqués pour échapper à l'environnement lysosomal qui leur est délétère, les amastigotes de *Leishmania* se sont adaptés à ce biotope. De fait, les amastigotes sont des organismes

acidophiles et résistants aux hydrolases lysosomales. Ainsi, à ce stade parasitaire, l'incorporation des nucléosides, du glucose, de la proline et leur métabolisme sont optimum entre pH 4 et 5,5 alors que ces activités sont optimum à des pH proches de la neutralité au stade promastigote. Les causes de la résistance aux hydrolases et notamment aux protéases environnementales ne sont pas connues. Une faible expression de protéines dans la membrane plasmique des amastigotes et leur masquage par les très nombreux GIPLs présents dans ce site pourraient être à la base de cette propriété. Une autre caractéristique des amastigotes qui pourrait être impliquée dans leur adaptation au compartiment lysosomal est l'expression abondante et constitutive de certaines protéines de stress [Antoine et al., 1994, 2000].

III. Traitement.

La thérapeutique des leishmanioses est dominée, depuis le début du siècle, par les dérivés stibiés qui demeurent, encore de nos jours, les médicaments de première intention. Toutefois, au cours de la co-infection leishmaniose viscérale/infection VIH, ou dans les cas de résistance fréquente aux antimoniés (leishmaniose cutanéomuqueuse, kala-azar Est-africain ou indien), l'amphotéricine B tend à s'imposer en première intention, surtout sous sa forme encapsulée dans les liposomes (AmB®). La pentamidine ne garde son rôle de produit alternatif que dans les leishmanioses tégumentaires.

Ces divers produits ont des propriétés et des effets mieux connus depuis une douzaine d'années et leur prescription est mieux codifiée. Ils n'en demeurent pas moins d'utilisation délicate compte tenu de leur voie d'administration exclusivement parentérale et de leur toxicité. Ils sont en outre coûteux, ce qui rend souvent problématique leur utilisation dans des populations de niveau socio-économique faible, vivant dans des régions de faible couverture médicale. Le problème de la recherche de substances antileishmaniennes nouvelles se pose dès lors avec acuité.

De nombreux produits sont réputés leishmanicides au vu d'expérimentations *in vitro* tels que l'atovaquone. Dans un tout autre registre, l'immuno-stimulation par IFN- γ a fait l'objet d'essais cliniques probants.

A) Antimoniés pentavalents.

Leur mécanisme d'action n'a jamais été exploré et demeure mal connu. L'antimoine a une action inhibitrice sur la synthèse de l'ATP, sur l'oxydation glycolytique et sur celle des acides gras [Berman et al., 1988]. Il n'est pas impossible que les sels d'antimoine n'aient à être concentrés dans le macrophage ou transformés en métabolites actifs (dérivés trivalents) pour être efficaces.

L'efficacité des antimoniés dans le traitement des leishmanioses est confirmée par plus d'un demi-siècle d'utilisation. Pourtant ces produits ont fait l'objet de recommandations d'emploi très diverses, pour tenter d'améliorer leur efficacité et de diminuer leurs effets toxiques. En fait, les essais randomisés réalisés ces dernières années ont montré que l'efficacité de ces produits était corrélée à la dose cumulée administrée, ce qui a conduit à la recommandation de traiter à la dose de 20 mg Sb^V/kg/jour, sans limitation de dose [Herwaldt et al., 1992].

Le défaut de réponse aux antimoniés de certaines formes de leishmanioses a été signalé à maintes reprises dans certains foyers endémiques de LV et de LCM. Il ne saurait toutefois être automatiquement rapporté à une résistance de la souche de parasite, en raison de la multiplicité des protocoles thérapeutiques employés et de la variation des doses d'antimoine administrées. Pourtant, des souches authentiquement résistantes aux antimoniés ont été isolées de patients non répondeurs au traitement.

B) Amphotéricine B (Fungizone[®], AmB[®]).

Antibiotique polyénique isolé en 1955 d'un *Streptomyces* du sol, l'amphotéricine B est un antifongique puissant utilisé dans le traitement des mycoses systémiques. Son statut évolue actuellement de produit alternatif pour les leishmanioses résistantes aux antimoniés, à celui d'antileishmanien de première intention au cours de la leishmaniose viscérale de l'immunodéprimé ou de la leishmaniose muqueuse.

L'amphotéricine B inhibe la déméthylation du lanostérol qui s'accumule de façon anormale et provoque des modifications de la perméabilité de la membrane parasitaire entraînant une perte de substances vitales. Elle agirait en outre également sur les macrophages en stimulant leur production et en augmentant leurs capacités phagocytaires.

L'amphotéricine B et un antileishmanien très puissant, dont l'efficacité chez le hamster expérimentalement infecté est supérieure à celle des antimoniés. De même, dans la LV, en Inde, elle a montré un pourcentage de guérison (100 %) supérieur à celui de l'antimoine pentavalent (80 %) [Thakur et al., 1993]. Elle est également supérieure aux antimoniés dans le traitement de la LCM grave. Malheureusement cette guérison est associée à une forte toxicité rénale, hépatique et hématologique.

C) Pentamidine.

La pentamidine est une diamine aromatique synthétisée dès la fin des années 1930. Il en existait deux sels : le mésylate de pentamidine, dont la spécialité, la Lomidine[®], a été retirée du marché européen en 1990 et n'existe plus que pour l'usage vétérinaire, et l'iséthionate de pentamidine, commercialisé sous le nom de Pentamidine[®] et plus récemment, de Pentacarinat[®]

Le mésylate de pentamidine a été largement utilisé dans le traitement et la prévention de la trypanosomose humaine africaine. Dans le domaine des leishmanioses, il a été principalement employé comme médicament alternatif de la LV infantile, en cures alternées avec le Glucantime[®], ou encore comme drogue de première intention dans le traitement de la leishmaniose cutanée (LC) à *L. guyanensis* en Guyane française [Pradinaud et al., 1991].

Le Pentacarinat[®] correspond à une nouvelle présentation de l'iséthionate de pentamidine couramment utilisé antérieurement sous le nom de Pentamidine[®] dans le traitement de diverses formes viscérales et cutanées de leishmaniose en Inde et en Afrique de l'Est.

L'efficacité du mésylate paraissait légèrement supérieure à celle de l'iséthionate, avec cependant un effet diabétogène plus marqué.

D) Aminosidine sulfate.

L'aminosidine est un antibiotique aminoside naturel à noyau deoxystreptamine, produit par un *Streptomyces* et de formule chimique identique à la paromomycine. Le mode d'action de l'aminosidine est analogue à celui de la streptomycine et que ce produit agit en inhibant la synthèse de protéines parasites par liaison au ribosome.

L'aminosidine a une activité anti-parasitaire dirigée contre certains protozoaires (leishmanies, amibes, *Giardia*) et contre divers cestodes intestinaux.

Elle est proche de la monomycine employée couramment par les auteurs russes depuis de nombreuses années pour le traitement des leishmanioses cutanées.

L'aminosidine a une activité antileishmanienne constatée *in vitro* et confirmée chez l'homme. Elle s'est révélée particulièrement efficace par voie parentérale dans le traitement de la LV, seule ou en association synergique avec les sels d'antimoine, au Kenya [Chunge et al., 1990] et en Inde [Thakur et al., 1992]. Dans les LC, son utilisation parentérale est apparue aux utilisateurs d'efficacité plus réduite, inférieure à celle des antimoniés pentavalents [Hepburn et al., 1994; Soto et al., 1994].

E) Allopurinol.

L'allopurinol est un analogue structural de l'hypoxanthine couramment utilisé dans le traitement de l'hyperuricémie, il intervient dans le métabolisme des purines en s'incorporant à l'ARN parasite pour lequel il a un effet létal.

L'utilisation dans le traitement des leishmanioses humaines a été motivée par l'efficacité du produit *in vitro*.

Des essais cliniques ont été effectués dans diverses formes de leishmanioses, viscérale, cutanée et muqueuse, du produit seul ou en association aux antimoniés, avec des résultats contradictoires, qui nécessitent une validation préalable. Dans des essais randomisés sur des séries de patients consécutives, l'association allopurinol/antimoniés n'est pas plus efficace que l'antimonié seul, aussi bien dans la LV que dans la LCM. En revanche, dans la LC à *L. panamensis*, l'allopurinol soit seul, soit en association avec les antimoniés, s'est avéré efficace [Martinez et al., 1992].

F) Imidazolés.

Les dérivés imidazolés constituent une famille particulièrement fournie d'antifongiques de synthèse. Certains d'entre eux, dont le kétoconazole ou Nizoral® et l'itraconazole ou Sporanox®, tous sont crédités d'une activité antileishmanienne pas toujours définitivement établie.

Les imidazolés inhibent le cytochrome P450, bloquant la synthèse des stérols membranaires, leur activité aboutit à une désorganisation interne des organelles aboutissant à la mort cellulaire.

Les imidazolés présentent un large spectre antifongique pour la plupart des agents des mycoses superficielles et profondes. La facilité de leur administration orale et leur bonne tolérance les ont fait appliquer au traitement de diverses formes de LC tant de l'Ancien que du Nouveau Monde, avec des résultats contradictoires. De quelques essais portant sur des groupes consécutifs ou conduits avec groupe-contrôle, il ressort que le kétoconazole a une efficacité assez bonne dans la LC à *L. mexicana* (Navin et coll., 1992), mais faible, avec des taux de guérison ne dépassant pas 30 % dans les LC à *L. guyanensis* [Dedet et al., 1986] ou *L. braziliensis* [Navin et al., 1992]. L'itraconazole a été efficace dans seulement 25 % des cas de LC en Colombie [Soto-Mancipe et al., 1993], contre 60 % en Inde [Dogra et al., 1990].

G) Interféron gamma (IFN- γ).

L'IFN- γ est une lymphokine produite naturellement par les lymphocytes T helper et les cellules tueuses NK après stimulation par certains antigènes ou mitogènes. Il possède de nombreuses propriétés immunodulatrices, dont l'activation des M Φ . L'IFN- γ -lb recombinant humain est actuellement produit industriellement par génie génétique chez *E. coli* (Imukin®, Boehringer Ingeiheim) et utilisé en association pour réduire les infections graves chez les patients présentant une agranulocytose chronique.

Le défaut d'activation des macrophages parasités par IFN- γ est considéré comme un des éléments fondamentaux du développement de l'infection leishmanienne. C'est

pourquoi l'apport d'IFN- γ de synthèse est conçu comme moyen thérapeutique substitutif destiné à relancer la production de radicaux oxygénés et de dérivés nitrogénés et augmenter l'activité microbicide des M Φ . Mais, cette lymphokine possède des effets pléiotropes et n'agit pas uniquement par une activation des M Φ . Ses effets antileishmaniens reposent également sur d'autres propriétés immunomodulatrices dont : l'augmentation de l'expression des molécules d'histocompatibilité de classe II à la surface des M Φ et la présentation de l'antigène aux lymphocytes T, l'action sur la différenciation des lymphocytes Th0 en Th1 et la prolifération des Th1, ainsi que la stimulation des cellules cytotoxiques NK et CD8. Enfin, l'IFN- γ est connu pour accroître *in vitro* l'activité antileishmanienne des dérivés antimoniés [Murray et al., 1988 ; Squires et al., 1993].

IV. aspects de santé publique et lutte contre *Leishmania*.

On considère actuellement que les leishmanioses, répandues sur quatre continents, sont endémiques dans 88 pays (21 dans le Nouveau Monde et 66 dans l'Ancien Monde). Parmi ces pays, 16 sont des pays industrialisés et 72 en voie de développement dont 13 parmi les moins développés. Plus de 90 % des cas de leishmaniose viscérale (LV) proviennent du Bangladesh, du Brésil, de l'Inde et du Soudan, tandis que plus de 90 % des cas de leishmaniose cutanée (LC) sont issus de l'Afghanistan, de l'Iran, de l'Arabie saoudite et de la République arabe syrienne pour l'Ancien Monde, du Brésil et du Pérou pour le Nouveau Monde.

A) Impact de *Leishmania* sur la santé publique.

Dans le passé, on admettait couramment que l'incidence annuelle mondiale était de 400 000 cas (300 000 pour les LC et 100 000 pour les LV), la prévalence globale 12 millions de cas et la population exposée 350 millions (OMS, 1990). Des publications antérieures, telles que celles de Walsh & Warren (1979) et de l'OMS (1981) ainsi que les conclusions du Comité OMS d'experts sur la lutte contre les leishmanioses (OMS, 1990) avaient permis d'établir les données chiffrées sus-mentionnées. Un examen exhaustif, pays par pays, des données disponibles a permis d'estimer plus précisément le nombre de cas diagnostiqués et notifiés chaque année [Desjeux et al., 1993]. Dans bien des cas, on ne dispose de données chiffrées que sur

peu d'années. Ce sont habituellement des années durant lesquelles des études spécifiques ont été entreprises ou pendant lesquelles des épidémies ont eu lieu. Lorsque c'était possible, on a établi une moyenne pour cinq années récentes. La plupart des données ont été obtenues en sélectionnant, pays par pays, les publications les plus fiables, ou en recueillant les données disponibles mises à jour lors de la visite des pays ou à l'occasion de projets de recherche.

On admet cependant que les données officielles sont largement sous-estimées, du fait d'un certain nombre de facteurs limitants, parmi lesquels:

- La distribution géographique des sites de transmission dans les zones d'endémie, qui est le plus souvent discontinue (distribution en "taches"), avec des foyers séparés et très dispersés.
- Dans de nombreux cas l'absence de diagnostic, en particulier lorsque les patients n'ont pas accès aux structures sanitaires, faute de personnel qualifié pour le diagnostic, ou lorsque les médicaments ne sont pas disponibles.
- L'obtention des données officielles exclusivement par dépistage passif.

En ce qui concerne la LV, la fréquence des personnes infectées asymptomatiques (sans signes cliniques) est beaucoup plus grande que celle des cas cliniquement patents (partie émergée de l'iceberg) [Badaro et al., 1986]. L'augmentation dans le sud de l'Europe du nombre de cas de LV, chez les adultes, associés au VIH (25 à 70 %), et le fait que, dans la même zone, 1, 5 à 9 % des sujets atteints par le SIDA souffrent de LV nouvellement contractée ou réactivée, l'illustrent clairement [WHO, 1995].

Enfin, malgré le peu de données fiables, il ne fait aucun doute que le nombre de cas dans le monde est considérablement plus élevé que celui des cas officiellement notifiés, le nombre de personnes infectées étant encore plus grand [WHO, 1986, Badaro et al., 1986 ; Desjeux, et al., 1993].

Actuellement, l'estimation de l'incidence annuelle mondiale [Desjeux, et al., 1993] se situe entre 1,5 et 2 millions de cas, se répartissant de la façon suivante:

- 1 à 1, 5 millions de LC.
- 500 000 de LV.

Pendant de nombreuses années, l'impact des leishmanioses sur la santé publique a été grossièrement sous-estimé, principalement par manque de reconnaissance de la gravité du problème. Au cours des deux dernières décennies, il est devenu évident que la plupart des formes cliniques de la leishmaniose sont beaucoup plus fréquentes qu'on ne l'avait soupçonné, en terme d'incidence et d'extension géographique : le nombre de cas ne cesse de croître au niveau mondial, la distribution géographique s'étend, de nouvelles zones d'endémie apparaissent, aggravant le problème en termes de santé publique.

Les données suivantes, considérées souvent comme des sous-estimations de la réalité, l'illustrent aisément :

- LC en Tunisie: 1 300 cas en 1983, 6 000 par an depuis 1990.
- LC en Turquie (ville d'Urfa) : 550 cas en 1990, 7 000 en 1996.
- LC en Syrie: 1 650 cas en 1987, 10 000 en 1993, 16000 en 1996.
- LC dans le nord-est du Brésil : 2 000 cas en 1980, 9 000 en 1993.
- LV au Bangladesh : 2 300 cas en 1988, 15 000 en 1996.

La situation s'aggrave à l'Est de l'Inde (état du Bihar), où 38 des 42 districts font face à la pire épidémie de kala-azar depuis la fin des années 1970; on estime qu'entre 200 000 et 250 000 personnes ont contracté la maladie en 1996 (soit cinq fois les chiffres officiels). La situation est alarmante du fait de l'extension rapide du problème.

Des rapports récents en provenance du Haut-Nil occidental (Soudan du sud) signalent, pour une population de moins d'un million de personnes, 15 000 cas traités et 100 000 décès imputables au kala-azar au cours des cinq dernières années.

B) Facteurs de risque.

Différents facteurs de risque liés au comportement, à l'environnement ou au développement, permettent d'expliquer une telle détérioration:

- L'installation de populations dans des zones d'endémie, répondant à des schémas de colonisation comme ceux des pays andins où, pour résoudre le problème démographique et le manque de terres agricoles, les populations doivent émigrer des hauts plateaux vers les basses plaines tropicales, où les risques de transmission sont très élevés.
- Les mouvements de populations à grande échelle pour raison professionnelle, par exemple entre le Bangladesh, l'Inde et le Népal ou encore le déplacement massif des travailleurs asiatiques vers les pays de la péninsule arabique.
- Le développement de nouveaux projets agricoles ou industriels, amenant des populations non immunisées dans des zones d'endémie, comme la construction de routes, la recherche pétrolière, les prospections minières, les activités agricoles, l'exploitation forestière, mais aussi le tourisme ou les activités militaires. La pression démographique dans le monde entier pousse les populations vers des régions où l'infection est endémique, accroissant ainsi le risque de contact avec les vecteurs naturels.
- L'urbanisation accélérée (par ex. Isfahan en Iran) et/ou non planifiée (par ex. Manaus au Brésil, etc.) englobant des zones rurales avoisinantes où sévit le cycle zoonotique.
- La détérioration du tissu économique et social dans les banlieues des villes, où des populations à faibles revenus s'accumulent à cause d'un exode rural massif, facilitant ainsi l'apparition d'épidémies (Alep en Syrie, Kaboul en Afghanistan).
- Les modifications de l'environnement du fait de l'homme (construction de barrages, systèmes d'irrigation, puits) comme dans le bassin Amazonien, en Arabie Saoudite ou en Tunisie.
- La réduction ou l'achèvement des campagnes de pulvérisation d'insecticides pour la lutte contre le paludisme. Après le succès des plans de lutte, plusieurs pays ont fait face à de graves résurgences (Bangladesh, Colombie, Inde, Iran, Pérou, pays méditerranéens...) en raison de l'interruption du programme.

C) Méthodes de lutte.

1- Principes.

La diversité de l'épidémiologie des différentes formes de la maladie rend impossible l'utilisation pour la lutte d'une seule approche ou d'un seul outil.

Au cours de la réunion du Comité d'experts sur la lutte contre les leishmanioses en 1990, la complexité des diverses manifestations de la leishmaniose à travers le monde a été ramenée à 11 entités éco-épidémiologiques ; parallèlement les méthodes et stratégies de lutte contre chacune d'entre elles ont été définies (Série de Rapports techniques de l'OMS, n° 793, 1990). Depuis, de nombreux pays ont adopté ces directives. Un document-cadre estimant le coût et le rendement des différentes méthodes de la lutte antileishmanienne a été largement distribué.

L'OMS donne la priorité aux initiatives de "lutte minimale" visant à assurer au moins le dépistage, le traitement et la déclaration précoce des cas de leishmaniose. Cela suppose la disponibilité constante des médicaments spécifiques de première intention dans tous les centres de santé, y compris les plus éloignés. Souvent, la communauté internationale est appelée à intervenir dans cette phase d'urgence pour participer à l'effort financier. L'objectif est de ramener, aussi vite que possible, la maladie à un niveau où chaque pays peut intégrer, tant du point de vue économique que technique, les activités de lutte et de surveillance dans le cadre de sa politique globale de santé.

Le plus souvent, les outils de la lutte antileishmanienne existent, mais leur emploi est fréquemment incorrect et leur évaluation inadéquate.

2- Priorités.

La plus grande priorité doit être accordée aux foyers anthroponotiques du sous-continent indien (LV), de l'Afrique de l'Est (LV) et de la Méditerranée orientale (LC). La définition de cette priorité repose sur les critères énoncés ci-dessous :

- Ces foyers sont à l'origine de problèmes majeurs de santé publique (graves épidémies en cours) ; il y a par conséquent une forte volonté politique de les éliminer.

- Les chances de succès sont plus grandes que pour les foyers zoonotiques, du fait de la faible dispersion des vecteurs impliqués (*Phlebotomus sergenti* et *P. argentipes*, limités aux zones domestiques et/ou péri-domestiques), et du fait de la transmission uniquement d'homme à homme par l'intermédiaire du vecteur en l'absence de réservoirs animaux.
- Le succès des campagnes de lutte dans certains pays a montré que la bataille contre les leishmanioses dans les foyers anthroponotiques peut être gagnée. C'est ainsi qu'en Chine, la leishmaniose viscérale a été éliminée des plaines du nord-est. Les foyers urbains de leishmaniose cutanée anthroponotique ont été également éliminés en Azerbaïdjan, en Israël, au Kazakhstan et au Turkménistan. La phase d'attaque lors de l'éradication du paludisme au Bangladesh, en Inde et au Népal dans les années 1960 a eu pour effet secondaire de faire disparaître presque complètement la leishmaniose viscérale.
- De nouvelles technologies simples, fiables et peu onéreuses, sont récemment devenues disponibles, notamment pour le diagnostic sérologique.

Par contre, un degré moindre de priorité est accordé aux efforts de lutte contre les foyers de leishmaniose zoonotique (viscérale et cutanée), sauf dans le cas d'infections simultanées par les leishmanies et le VIH ou lors de l'apparition d'épidémies.

V. Vaccination anti-*Leishmania*.

Face au fléau que représentent les leishmanioses, une seule mesure apparaît opportune : la prévention par une vaccination efficace et sans complications secondaires. L'espoir d'aboutir, par une immunoprévention, à l'éradication progressive de ces affections repose sur plusieurs observations historiques.

Une immunité de longue durée et hétérologue apparaît, généralement, après l'infection leishmanienne. Ainsi, une prévention empirique contre la LC fut réalisée, pendant des siècles, au Moyen Orient. Afin d'éviter les cicatrices inesthétiques apparaissant au visage, les mères exposaient les fesses des bébés et des jeunes enfants aux piqûres des phlébotomes ; la présence de lésions cutanées actives, s'avérant immunisante, prévenait

l'apparition de lésions de la face. Ce procédé était élémentaire. Il fut suivi de la leishmanisation (cousine de la variolisation) apparue au XVI^e siècle dans l'Empire Ottoman. Cette méthode consistait à prélever du tissu lésionnel parasité et à l'inoculer, par voie intradermique, aux résidents des zones d'endémie leishmanienne. Les lésions tégumentaires apparaissant quelques mois plus tard, conféraient, après guérison spontanée, une immunoprotection à long terme. Des protocoles de leishmanisation, comportant l'injection de promastigotes isolés de milieux de culture [Nicolle et al., 1910 ; Manson et al., 1914]), furent inaugurés au début du siècle, puis développés en URSS [Lawrow et al., 1937 ; Serebryakov et al., 1968 ; Shuikina et al., 1968], en Israël [Greenblatt et al., 1980] et en Iran [WHO, 1986]. Pouvant induire une protection inconstante et générant, parfois, de redoutables manifestations cliniques (ulcères chroniques, allergies, psoriasis, etc.), ils ont été abandonnés sous la pression de l'Organisation Mondiale de la Santé.

Les mécanismes effecteurs responsables de l'immunoprotection post-leishmanisation sont encore mal connus. Les données acquises sont les suivantes: la protection s'accompagne de réponses immunitaires humorale et cellulaire vis-à-vis des antigènes leishmaniens [Green et al., 1983] ; elle semble hétérologue ; induite par *L. major*, elle paraît efficace contre *L. infantum*. Des essais de leishmanisation, réalisés avec des souches du Nouveau Monde (*L. mexicana*) entraînent, aussi, l'apparition d'une immunité de longue durée contre la leishmaniose cutanée [Liew et al., 1993]. Vraisemblablement liée à la présence d'une population de cellules T à mémoire, elle se manifeste, également, après inoculation de *L. donovani*, par une protection contre la forme viscérale de l'infection [Manson-Bahr et al., 1961].

A) Stratégies de vaccination anti-*Leishmania*.

Un vaccin idéal serait capable: 1/ de bloquer la pénétration des promastigotes dans les cellules histio-monocytaires ou 2/ d'empêcher la survie des promastigotes infectieux dans le phagolysosome ou 3/ d'inhiber la multiplication des amastigotes dans le compartiment lysosomal ou 4/ de neutraliser l'infectivité des amastigotes libérés après l'éclatement des cellules hôtes. Les deux premières stratégies débouchent sur l'élaboration d'un vaccin anti-promastigotes et les suivantes sur la production d'un vaccin anti-amastigotes. Elles peuvent être développées séparément ou

associées dans l'espoir d'une meilleure efficacité. Apparaîtraient alors des vagues successives de réponses immunitaires tout au long du cycle d'évolution des promastigotes et des amastigotes.

En fait, il est très possible, en raison de leurs multiples communautés antigéniques, qu'un vaccin contre le premier stade puisse aussi protéger contre le second. Des préparations de protéines, isolées à partir de promastigotes tués, pourraient présenter cette double fonction. Reste, avant de le prouver, à déterminer la composition de ces "soupes antigéniques", qu'il faut caractériser, standardiser et tester, tout d'abord, dans des modèles animaux expérimentaux.

Les mêmes régies s'appliqueront aux vaccins, obtenus par purification biochimique ou génie génétique, ayant pour cible un seul stade du parasite. Car, si une parfaite sélection des antigènes peut entraîner l'apparition d'une immunoprotection contre l'infection leishmanienne, un mauvais choix peut, au contraire, générer une exacerbation de l'infection. C'est ainsi qu'un épitope T de *Leishmania major* est capable d'aggraver une leishmaniose murine via la production de taux élevés d'IL-4 et l'inhibition des sécrétions d'IL-2 et d'IFN- γ [Liew et al., 1990].

B) Vaccins de première génération.

1- Vaccins composés de promastigotes atténués.

Les préparations antigéniques comportent des promastigotes, en phase stationnaire de croissance, isolés à partir de milieux de culture. Viables, leur pathogénicité est modérée, voire nulle, suite à une exposition à des agents physiques ou chimiques. Ils conservent leur immunogénicité, mais perdent une partie de leur capacité à se multiplier dans la cellule hôte.

L'immunisation de souris BALB/c, avec des promastigotes de *L. major* à virulence atténuée par γ -irradiation ou mutagénèse chimique, entraîne l'apparition d'une immunoprotection anti-leishmanienne. Elle est efficace contre les deux stades du parasite (promastigote et amastigote) [Liew et al., 1984 ; Rivier et al., 1993] et ne

s'acquiert qu'après injection intrapéritonéale ou intraveineuse, avec association ou non d'adjuvants aux antigènes leishmaniens.

La protection est transférée à des souris syngéniques naïves par administration de lymphocytes T CD4 de type Th1 [Kimsey et al., 1993].

2-Vaccins composés de promastigotes tués.

Ils induisent une immunoprotection, qui paraît aussi efficace que la précédente, à parasites atténués. La viabilité ne semble donc pas un critère indispensable, comme le démontrent les exemples suivants.

Essais de vaccination en modèle murin:

Après différents traitements : γ -irradiation et congélation/décongélation ; γ -irradiation et sonication ; chauffage avec ou sans γ -irradiation ; ou, enfin, formolisation, des promastigotes de *L. major* sont capables d'induire, après administration par voie intraveineuse ou intra-péritonéale à l'animal (souris BALB/c), une protection contre une infection expérimentale à *L. major* [Liew et al., 1984 ; Scott et al., 1987].

Des préparations vaccinales de promastigotes tués sont actuellement à l'étude dans plusieurs essais d'immunisation humaine.

Au Brésil, des essais de vaccination ont permis d'obtenir une immunoprotection relative. Les vaccins comportent un mélange complexe de promastigotes (jusqu'à 5 espèces de leishmanies) tués par la chaleur ou le phénol [Mayrinck et al., 1978, 1979, 1985 ; Antunes et al., 1986 ; Nascimento et al., 1990]. Injectés par voie intramusculaire, ils ne provoquent pas de réactions secondaires indésirables et pourraient diminuer l'incidence annuelle des leishmanioses. Une incertitude, toutefois, demeure, car plusieurs facteurs non maîtrisables sont intervenus lors de la campagne de vaccination (ex: forte régression de l'endémie leishmanienne dans la zone d'étude ; administration de vaccin anti-amaril post-vaccination anti-leishmanienne). L'analyse de la réponse immunitaire *in vitro* met en évidence une forte prolifération des lymphocytes des sujets immunisés au contact des antigènes vaccinaux, mais la réaction est bien moins évidente vis-à-vis de *L. chagasi*. En outre, une production d'IFN- γ est aussi, détectée lors de l'épreuve de stimulation antigénique. Un an après la vaccination, les

tests de transformation lymphoblastique s'avèrent toujours positifs, le phénotype CD8⁺ étant dominant dans la population lymphocytaire activée. Ces résultats suggèrent que l'immunité cellulaire post-vaccinale présente une certaine spécificité d'espèce et que les lymphocytes T CD8⁺ y sont impliqués [Mendonça et al., 1995].

Un nouveau vaccin est à l'étude, composé de promastigotes de *L. amazonensis*, bien mieux caractérisés. L'essai de vaccination est multicentrique et réalisé dans plusieurs pays d'Amérique latine [WHO, 1995]. Une réaction positive au test de Montenegro a été considérée, dès la phase II du programme, comme un critère de protection potentielle.

Par ailleurs, au Pakistan et au Soudan, des préparations de promastigotes de *L. major* autoclavées sont administrées, en association avec du BCG, à des populations exposées aux infections leishmaniennes tégumentaire et viscérale.

3- Vaccins composés d'extraits antigéniques.

Des extraits antigéniques totaux et/ou particuliers (membranaires), des lysats de promastigotes et des fractions protéiques semi-purifiées sont classés dans la liste des candidats- vaccins.

Des extraits totaux et solubles de promastigotes de *L. major* [Scott et al., 1987], ou totaux + membranaires [Kahi et al., 1989], sont capables de protéger des souris BALB/c contre une infection à parasite homologue. L'injection d'un lysat de promastigotes induit, aussi, une protection partielle.

Préparée à partir d'une souche virulente de *L. mexicana/amazonensis*, une fraction microsomale (Pol-F), administrée à des souris Swiss Nude en association avec du BCG, entraîne une protection contre une infection homologue comportant 106 amastigotes [Gonçalves et al., 1988].

Recueillies après électrophorèse, 3 fractions protéiques (Li F2, Li F5 et Li F6) isolées à partir de *L. infantum* et injectées par voie sous-cutanée (souris BALB/c) ou intra-veineuse (C57BL/6) induisent une protection complète contre l'infection leishmanienne,

à *L. major* ou à *L. mexicana*. La résistance acquise avec LiF2 s'étend sur une période de plus de 6 mois [Monjour et al., 1984, 1985 ; Frommel et al., 1988].

Une fraction, dénommée PI, obtenue après filtration sur gel d'un lysat de promastigotes de *L. infantum*, protège des souris BALB/c contre une infestation expérimentale à *L. major* [Rolland et al., 1993]. Les immunisations par voie intra-péritonéale, en association avec du BCG, s'avèrent efficaces contre les leishmanioses cutanée et viscérale. Une réponse immunitaire cellulaire de type Th1 accompagne la protection.

Matériel et méthodes

I. Les souris.

Des souris BALB/c (Janvier, Le Genest S^t Isle, France) et Swiss-Nude (Charles River, Saint-Aubin-Les-Elbeuf, France) femelles sont utilisées pour la préparation des LD et le passage des souches de leishmanies.

II. Les micro-organismes.

La souche LV79 de *Leishmania amazonensis* (référence OMS : MPRO/BR /1972/ M1841) est entretenue par passages successifs dans des souris BALB/c ou des souris Nude. Pour ce faire, les souris sont infectées par inoculation de 10⁶ amastigotes dans les coussinets plantaires des pattes postérieures.

La souche BCG de *Mycobacterium bovis* préparée selon la méthode décrite par Gheorghiu et al. (1983), nous a été aimablement fournie par N. Winter (Unité de Génétique Mycobactérienne). Les bacilles sont lavés deux fois avec du milieu IMDM (voir ci-dessous) avant d'être utilisés.

A) Préparation des amastigotes.

Les souris BALB/c ou Nude infectées par *L. amazonensis* au niveau des coussinets plantaires développent des lésions à partir desquelles sont préparés les amastigotes [Antoine et al., 1989]. Deux à trois mois après l'infection, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. Les pattes arrières sont coupées et placées dans de l'éthanol à 70° pendant dix minutes afin de désinfecter l'extérieur des lésions. Les pattes sont ensuite placées dans du milieu de Hanks sans NaHCO₃ (Biochrom KG, Berlin, Allemagne) contenant 10 mM d'Hepes (acide N-2-hydroxy-éthylpiperazine-n-2'-éthanesulfonique) et 100 µg /ml de pénicilline/streptomycine (p/s) (Biochrom KG) (milieu HH). Les parties ulcérées sont ôtées et les lésions sont découpées puis broyées dans un potter. Deux centrifugations à faible vitesse (30 g, 10 min, 20°C) dans du milieu HH permettent d'éliminer les gros débris. Le surnageant est ensuite centrifugé à 1200 g (10 min,

20°C) ; le culot contenant les amastigotes est remis en suspension avec 1 ml de milieu HH auquel est ajouté 5 ml de tampon de Gey [Mishell et al., 1980] afin de lyser les globules rouges (incubation 5 min à température ambiante). Après plusieurs lavages des amastigotes avec du milieu HH, le culot obtenu est resuspendu avec 1 ml de milieu RPMI 1640 dépourvu de NaHCO_3 contenant 20 mM Hepes (Seromed, Berlin, Allemagne), et complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Dutscher, Brumath, France) et 50 U/50 $\mu\text{g/ml}$ p/s. La concentration en parasites de la suspension est estimée au moyen d'un hématimètre de Malassez puis la suspension est ajustée à 2×10^7 parasites par ml en utilisant comme milieu de dilution du RPMI 1640, 20 mM Hepes complémenté comme décrit ci-dessus. Les amastigotes sont alors placés pendant environ 18 heures à 34°C (température permissive pour la survie des amastigotes de la souche LV79 de *L. amazonensis*).

Afin d'éliminer les débris résiduels et les parasites morts présents dans les suspensions d'amastigotes préparées comme ci-dessus, des centrifugations sur gradients de Percoll sont réalisées. Les amastigotes sont resuspendus dans 1 ml de Percoll à 45% (Pharmacia, Uppsala, Suède) et seringués cinq fois à l'aide d'une aiguille 27G. Chaque suspension est ajustée à 3 ml avec du Percoll à 45% puis déposée sur une couche de Percoll à 90% (2 ml). Une centrifugation à 3500 g (40 min, 15 °C) permet de séparer les parasites des débris et des globules rouges résiduels. Les amastigotes vivants, situés à l'interface Percoll 45% / Percoll 90%, sont récupérés et lavés deux fois avec du milieu HH contenant 10% de Plasmion (Laboratoire Roger Bellon, Paris, France).

Les amastigotes issus de souris Nude sont utilisés tels quels pour l'infection des LD ou bien après incubation avec un immunsérum (IS) de souris BALB/c préparé à partir d'animaux infectés depuis 2 à 4 mois avec des amastigotes de *L. amazonensis*. Pour ce faire, des amastigotes sont incubés pendant 1 h à 4°C avec l'immunsérum de souris dilué au 1/1000 avec du PBS-Dulbecco puis ils sont lavés 3 fois avec du PBS.

B) Obtention des promastigotes métacycliques à partir d'amastigotes de *L. amazonensis*.

Les cultures de promastigotes sont initiées à partir d'amastigotes fraîchement préparés ou d'amastigotes conservés dans l'azote liquide. Les amastigotes (10^4 /ml) sont placés à 26°C dans du milieu Hosmem II [Berens et Marr, 1978] complet (20% SVF, 100 U/ μ g/ml p/s) où ils se différencient en promastigotes. Ces derniers se multiplient pendant quelques jours (phase de croissance logarithmique) puis la culture atteint une phase dite stationnaire, au cours de laquelle apparaissent des formes promastigotes métacycliques, très effilées et qui ne se divisent plus. Seules ces formes sont infestantes pour les hôtes mammaliens. Les promastigotes métacycliques présents dans les cultures en phase stationnaire sont purifiés sur gradients de Ficoll ou à l'aide de l'Ac monoclonal (m) 3A1 [Courret et al., 1999].

1- Purification sur gradients de Ficoll [Späth et Beverleley, 2001].

Les promastigotes sont lavés trois fois avec du PBS-Dulbecco (PBS) (centrifugation 3300 g, 10 min, 4°C). Le culot parasitaire est resuspendu avec du PBS puis les parasites sont déposés à la surface de gradients discontinus composés de trois couches de Ficoll : 20%, 10%, 5%. Après une centrifugation à 1300 g (15 min, 20°C), les promastigotes présents dans la moitié supérieure de la couche 5% sont récupérés. Ils sont alors lavés trois fois avec du PBS (centrifugation 3300 g, 15 min, 20°C) et sont ensuite placés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

2- Enrichissement des stades métacycliques après sélection négative par agglutination avec l'Ac m 3A1 [Courret et al., 1999].

Les promastigotes en phase stationnaire sont lavés trois fois avec du PBS (centrifugation 3300 g, 10 min, 4°C). La suspension parasitaire (2 à 5×10^8 parasites/ml) est incubée avec l'Ac m 3A1 (IgG2b de souris ; ascite au 1/500 final) pendant 30 min à température ambiante puis la suspension parasitaire est centrifugée (250 g, 5 min, 4°C). Les parasites non agglutinés contenus dans le surnageant sont récupérés et lavés trois fois avec du PBS. Ils sont conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Les deux méthodes décrites ci-dessus permettent de récupérer des parasites présentant des caractéristiques de promastigotes métacycliques (finesse du corps cellulaire, flagelle très long, grande mobilité).

III. Production de LD à partir de moelle osseuse de souris BALB/c.

Le protocole qui a été suivi est basé sur la méthode mise au point par N. Winter (Institut Pasteur, Paris, France. Travaux non publiés). Une souris âgée de 4 à 5 semaines est sacrifiée par dislocation cervicale. Les fémurs et tibias sont prélevés, nettoyés et placés dans du PBS sans Ca^{+2} , sans Mg^{+2} froid (toutes les étapes de cette préparation se font à 4°C et en utilisant du PBS sans Ca^{+2} , sans Mg^{+2}). Les os sont coupés à leurs deux extrémités et les cellules de la moelle osseuse sont récupérées en faisant passer 5 ml de PBS à travers chaque os à l'aide d'une aiguille 25G. Les cellules sont alors centrifugées 10 min à 300 g, puis remises en suspension avec 500 µl de PBS auxquels sont ajoutés 3 ml de tampon de Gey. Après 5 min d'incubation à 4°C, les cellules sont lavées avec du PBS et centrifugées à 300 g pendant 10 min à 4°C. Le culot cellulaire est resuspendu dans 1 ml de milieu de culture pour LD composé de milieu IMDM (Bio Whittaker, Verviers, Belgique) complété avec 10 % de SVF, 50 µM de mercaptoethanol (Gibco BRL), 50 U/µg/ml de p/s et 0,5 % de milieu conditionné J558 (surnageant d'une culture de cellules J558 sécrétant du GM-CSF). Les cellules sont alors passées à travers une aiguille 25G, comptées et distribuées dans des boîtes de Pétri bactériologiques hydrophobes de 100 mm de diamètre (Falcon, Franklin Lakes, USA) à raison de 2×10^6 cellules par boîte contenant chacune 10 ml de milieu de culture. Les boîtes sont placées à 37°C dans une atmosphère humide (93 % air, 7 % CO_2). Trois jours après la mise en culture (J_3), 10 ml de milieu de culture sont ajoutés dans chaque boîte. A J_6 , les cellules non adhérentes sont récupérées et centrifugées à 300 g (10 min, 4°C). Le surnageant de culture est récupéré et conservé. Le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu de culture. D'autre part, les cellules adhérentes sont incubées pendant 5 min à 37°C avec 1,5 ml d'une solution d'EDTA à 1% dans du PBS (Biochrom KG). Puis 8,5 ml de PBS froid sont ajoutés et les cellules ainsi remises en suspension sont centrifugées (300g, 10 min, 4°C). Les cellules non adhérentes et les cellules adhérentes sont poolées et resuspendues dans du milieu de culture complété avec 10% de surnageant de la primo-culture. Les cellules sont seringuées cinq fois à travers une aiguille 25G puis comptées et distribuées (mêmes conditions que la primo-culture). A J_{10} , les cellules

décrochées selon la technique décrite ci-dessus sont distribuées dans des boîtes à 6 puits hydrophobes (Evergreen, Los Angeles, USA) à raison de 9×10^5 cellules par puits (3 ml de milieu/puits). A J₁₃, 2 ml de milieu sont retirés de chaque puits de culture et remplacés par 2 ml de milieu complémenté (comme ci-dessus).

IV. Infection des LD avec *L. amazonensis*.

A J₁₄, les LD sont infectés avec des promastigotes ou des amastigotes de *L. amazonensis* ou bien avec des bacilles vivants de BCG (*Mycobacterium bovis* souche BCG) à raison de 4 parasites par LD ou de 10 bacilles par LD. Avant de procéder à l'infection, le nombre moyen de cellules présentes dans chaque puits a été estimé par une méthode déjà décrite [Nakagawara et al., 1983]. Dans les cas d'infections avec des promastigotes, l'addition des parasites est suivie d'une centrifugation des plaques à 150 g (5 min, 20°C) afin de faciliter leur contact avec les LD. Des cultures de cellules non infectées et infectées sont réalisées en parallèle à 34°C, température permissive pour la survie et la multiplication des parasites intracellulaires. Cinq heures après l'infection par le BCG, les bacilles non internalisés sont éliminés par lavage avec du milieu.

V. Analyse des parasites et des LD non infectés et infectés par microscopie à fluorescence.

A) Réactifs immunologiques.

Les réactifs utilisés sont listés dans le tableau 1.

Tableau 1. représente les différents réactifs immunologiques utilisés.

Anticorps primaires	Spécificité	Référence
Anticorps monoclonal (Ac m) 2A3-26 biotinylé ou non (IgG1 de souris)	reconnaît un Ag sur la membrane plasmique des amastigotes de <i>L. amazonensis</i>	Lang et al., 1994
Ac m 3A1 (IgG2b de souris)	reconnaît le LPG exprimé à la surface des promastigotes de <i>L. amazonensis</i> en phase de croissance	Courret et al., 1999
Ac m 2G9 biotinylé ou non (IgG2a de rat)	I-A ^d et I-E ^d	Becker et al., 1992
Ac anti-H2M (Ac polyclonal de lapin)	Chaîne β 1 de H-2M	C.Bonnerot et S. Amigorena, Institut Curie, Paris, France ; Antoine et al., 1999
Ac m MOMA-2 (IgG2b de rat)	reconnaît un antigène intracellulaire des macrophages murins	Kraal et al., 1987
Ac m 53-6.7 biotinylé (IgG2a de rat)	CD8	Ledbetter et al., 1979
Ac m 2D7 (IgG2a de rat)	chaîne α _L de CD11a (LFA-1)	Larson et al., 1990
Ac m HL3 biotinylé ou non (IgG groupe 1 d'hamster arménien)	gp150/CR4/ CD11c	Metlay et al., 1990
Ac m HM β 1.1 (IgG groupe 2 d'hamster arménien)	CD 29 (chaîne β 1 des intégrines)	Noto et al., 1995
Ac m 3/23 biotinylé ou non (IgG2a de rat)	CD 40	Mahnke et al., 1997
Ac m 3E2 biotinylé (IgG groupe1 d'hamster arménien)	CD 54 (ICAM-1)	Sceynius et al., 1993
Ac m 1610A1 biotinylé ou non (IgG groupe 2 d'hamster arménien)	CD80 (B7-1)	Razi-Wolf et al., 1992
Ac m GL1 biotinylé (IgG2a de rat)	CD86 (B7-2)	Hathcock et al., 1994
Ac m 1D4B (IgG2a de rat)	CD107a (LAMP-1)	Chen et al., 1985
Ac m ABL-93 (IgG2a de rat)	CD107b (LAMP-2)	Chen et al., 1985
Ac m FA/11 (IgG2a de rat)	Macrosialine	Smith et al., 1987
Ac m R2a 15 biotinylé (IgG2a de rat)	ovalbumine-DNP (contrôle isotypique)	Razi-Wolf et al., 1992
Ac m G21.10 (IgG1 de souris)	serotonine (contrôle isotypique)	J. L. Guesdon, Institut Pasteur, Paris, France
IgG groupe 1 d'hamster arménien (Ac m)	TNP (contrôle isotypique)	PharMingen, San Diego, USA

Tableau 1 (suite).

Conjugués	Spécificité	Référence
Fragment F(ab') ₂ d'Ac d'âne-TR (Texas Red)	IgG (H+L) de souris	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA.
Fragment F(ab') ₂ d'Ac d'âne-TR	IgG (H+L) de lapin	Jackson ImmunoResearch
Fragment F(ab') ₂ d'Ac d'âne-TR	IgG (H+L) de rat	Jackson ImmunoResearch
Streptavidine-TR	Biotine	Pierce, Rockford, USA
Streptavidine-PE (Phycoerythrine)	Biotine	Pierce
Fragment F(ab') ₂ d'Ac d'âne-FITC (Fluorescéine isothiocyanate)	IgG (H+L) de souris	Jackson ImmunoResearch
Fragment F(ab') ₂ d'Ac d'âne-FITC	IgG (H+L) de rat	Jackson ImmunoResearch
Fragment F(ab') ₂ d'Ac d'âne-FITC	IgG (H+L) de chèvre	PharMingen
Fragment F(ab') ₂ d'Ac de chèvre-FITC	IgG (H+L) de lapin	Jackson ImmunoResearch
Ac purifié de chèvre-Alexa Fluor 488	Chaîne μ de souris	Molecular Probes, Eugene, USA
Ac m G 70-204-Alexa Fluor 488 (IgG 1 de souris)	IgG d'hamster arménien (groupes 2 et 3)	PharMingen
Ac de chèvre-FITC	IgG (H+L) de souris	Sigma Chemical Corp., St Louis, USA
Streptavidine-Alexa Fluor-488	Biotine	Molecular Probes

B) Fixation et perméabilisation des leucocytes dendritiques.

A J₁₅ (24 h après l'addition des micro-organismes), ou à J₁₇ (72 h après l'addition des micro-organismes), les LD sont décrochés, seringués cinq fois avec une aiguille 25G et distribués dans des boîtes à 24 puits contenant dans chaque puits une lamelle de verre stérile préalablement recouverte de polylysine (Sigma). Chaque puits reçoit $1,2 \times 10^5$ cellules. Après incubation (30 min, 34°C), les cellules sont lavées avec du PBS puis fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) (Merck, Darmstadt, Allemagne) à 4% dans du tampon cacodylate de sodium, HCl 0,1 M, pH 7,4 (Prolabo, Paris, France). Après une heure à température ambiante, les cellules sont lavées avec du PBS (2 ml/puits, 10 min). Les groupements aldéhydiques libres sont ensuite bloqués par ajout de 2 ml de PBS contenant 50 mM de NH₄Cl par puits. L'incubation dure 15 minutes puis les cellules sont conservées à 4°C. Une solution de PBS contenant 0,1 mg/ml de

saponine (Sigma) et 10% de sérum de chèvre ou d'âne (Interchim, Montluçon, France) selon les anticorps primaires et les conjugués utilisés permet de perméabiliser les cellules et de bloquer les sites de fixation non spécifiques (500 µl/lamelle). Trente minutes plus tard, les cellules sont lavées avec du PBS contenant 0,1 mg/ml de saponine (PBS-sap; 2 ml/par puits).

C) Incubation avec les anticorps et montage des lamelles.

Les Ac primaires sont dilués dans une solution de PBS-sap contenant 0,25% de gélatine (PBS-sap-gel). Chaque lamelle est déposée sur 25 µl d'une solution d'Ac (ou d'un mélange d'Ac lorsqu'un double marquage est réalisé). Après une heure d'incubation à température ambiante, les lamelles sont lavées trois fois avec du PBS-sap (2 ml/puits, 10 min). Chaque lamelle est de nouveau incubée pendant 1 h sur 25 µl d'un conjugué fluorescent (ou d'un mélange de conjugués lorsqu'un double marquage est réalisé) approprié, dilué avec du PBS-sap-gel.

Après trois lavages avec du PBS-sap, les préparations cellulaires sont lavées avec de l'eau pyrolyse puis les lamelles sont montées avec du Mowiol (Sigma) sur des lames dégraissées. Après une nuit à température ambiante, les lames sont conservées à -20°C jusqu'à leur observation au microscope à fluorescence conventionnel ou au microscope confocale.

D) Détection des Ig présentes à la surface des amastigotes.

Des amastigotes issus de souris Nude ou de souris BALB/c infectés sont purifiés comme ci-dessus puis centrifugés (120 g, 5 min, 20°C) sur des lamelles ayant été préalablement recouvertes de polylysine (2×10^6 /lamelle). Après élimination du PBS, les parasites sont fixés avec du PFA comme indiqué pour les LD. Après incubation avec le NH_4Cl et le blocage des sites de fixation non spécifiques par du PBS contenant 10 % de sérum d'âne ou de chèvre, les parasites sont mis en contact avec des conjugués fluorescents anti-Ig de souris sans perméabilisation préalable avec la saponine. Après montage dans du Mowiol, les préparations sont observées comme indiqué ci-dessus.

VI. Analyse des LD non infectés et infectés par cytométrie en flux.

Après décrochage à J₁₅ (24 h après l'addition des micro-organismes), les cellules sont distribuées dans les puits d'une microplaque à 96 puits à fond rond. Après centrifugation (300 g, 5 min, 4°C), les culots cellulaires sont remis en suspension et les cellules sont incubées à 4°C pendant 30 min dans du PBS contenant 1% de SVF, 0.05% de NaN₃ (PBS-SVF-NaN₃) et 10% de sérum provenant de l'espèce ayant servi à la production des Ac secondaires, ceci pour permettre une saturation adéquate des sites de fixation non spécifiques.

A) Détection de molécules exprimées à la surface cellulaire.

Les cellules sont centrifugées puis mises en contact avec la solution contenant le premier Ac m ou l'isotype contrôle. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du PBS-SVF-NaN₃ puis incubées 30 min à 4°C avec le conjugué fluorescent. Après 2 lavages, les cellules sont fixées et perméabilisées (30 min, 4°C) avec le réactif Cytotfix/Cytoperm (PharMingen).

B) Détection des parasites intracellulaires.

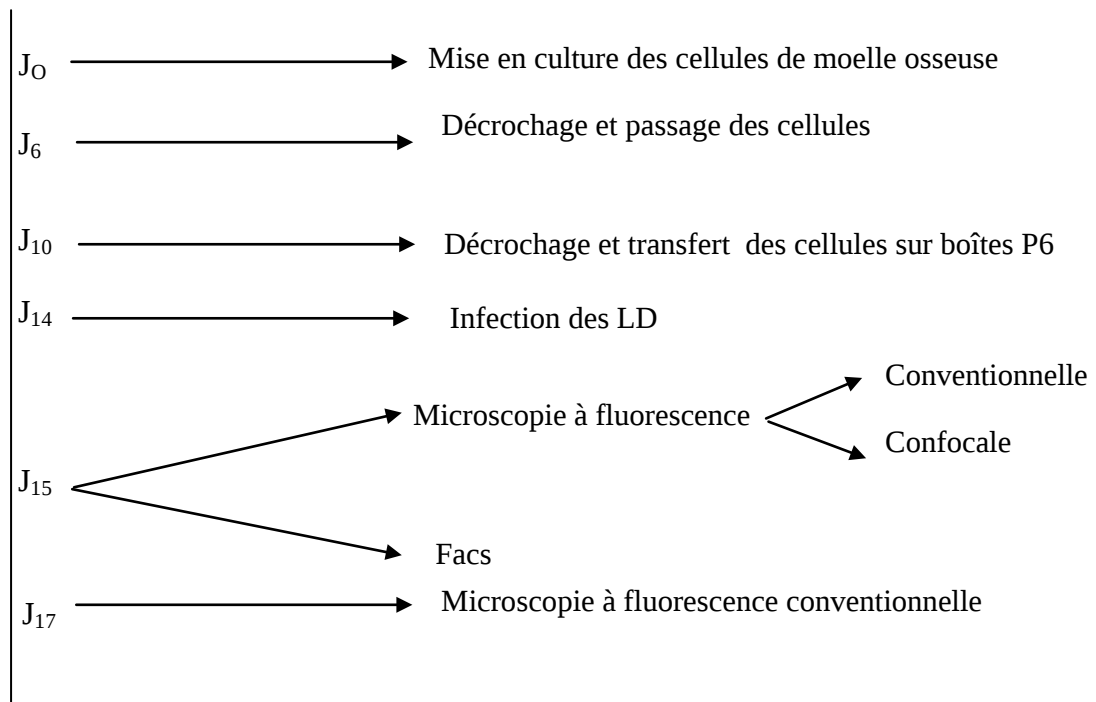
Afin de détecter les parasites intracellulaires, les LD sont incubés dans le réactif Perm/Wash (PharMingen) successivement avec l'Ac m 2A3-26 et des fragments F(ab')₂ d'anticorps d'âne anti-Ig souris-FITC. Après 2 lavages en Perm/Wash, les LD sont encore lavés 2 fois en PBS-SVF-NaN₃ puis conservés à 4°C jusqu'à l'acquisition.

C) Acquisition.

Les cellules sont transférées dans des tubes Falcon dans un volume final de 1ml (PBS- SVF-NaN₃) puis analysées à l'aide d'un cytofluorimètre en flux (FACScan, Becton-Dickinson, San José, Etats-Unis). L'acquisition et l'analyse se font à l'aide du logiciel Cell-Quest. Après mise en place d'une fenêtre permettant l'élimination des débris, 15 à 20 000 évènements de fluorescence sont enregistrés.

Un résumé des conditions expérimentales suivies pour la préparation des LD et pour leur infection est présenté dans le schéma suivant:

Conditions expérimentales :



Résultats

I. Caractérisation morphologique de la population leucocytaire obtenue après culture de précurseurs médullaires en présence de GM-CSF.

Quinze jours après la mise en culture de cellules de moelle osseuse de souris BALB/c dans les conditions précisées ci-dessus (voir chapitre III-A de la section "Matériel et Méthodes"), les cellules sont récupérées par un traitement à l'EDTA et déposées sur des lamelles de verre. Après fixation, les cellules sont soumises à un examen microscopique. Deux types cellulaires peuvent être distingués sur la base de critères morphologiques : des LD ronds ou allongés présentant de nombreuses dendrites (Fig. 1) et des cellules ayant l'aspect de macrophages (MΦ). Celles-ci, généralement de taille plus importante que les LD et très vacuolées dans ces conditions de culture, représentent seulement 9% de la population cellulaire (Fig. 2).

II. Etude de l'infection des LD par des promastigotes ou des amastigotes de *L. amazonensis*.

A J₁₄, les leucocytes sont mis en présence de promastigotes ou d'amastigotes de *L. amazonensis*. Les parasites utilisés dans cette première série d'expériences ont été préparés comme suit. Les promastigotes ont été purifiés sur gradients de Ficoll comme indiqué dans la section "Matériel et Méthodes (chapitre II-B-1). D'autre part, des amastigotes ont été isolés de lésions de souris Nude.

Vingt-quatre heures après l'addition des promastigotes ou des amastigotes aux cultures leucocytaires, on note que, respectivement, 36% et 15% des LD sont infectés et qu'ils contiennent chacun 1 à 3 parasites ; Quant aux MΦ contaminants, ils sont presque tous infectés quelles que soient les formes parasitaires ajoutées aux cultures et contiennent chacun un beaucoup plus grand nombre de parasites (jusqu'à plusieurs dizaines) (Fig. 3).

Figure 1. Morphologie des LD dérivés de précurseurs médullaires de souris BALB/c cultivés en présence de GM-CSF.

A J₁₅, les cellules sont prélevées des boîtes de culture hydrophobes, déposées sur des lamelles recouvertes de polylysine puis fixées avec du PFA avant leur observation au microscope optique. (A) contraste de phase, (B) contraste interférentiel différentiel. Les dendrites émises par les cellules sont indiquées par des flèches.

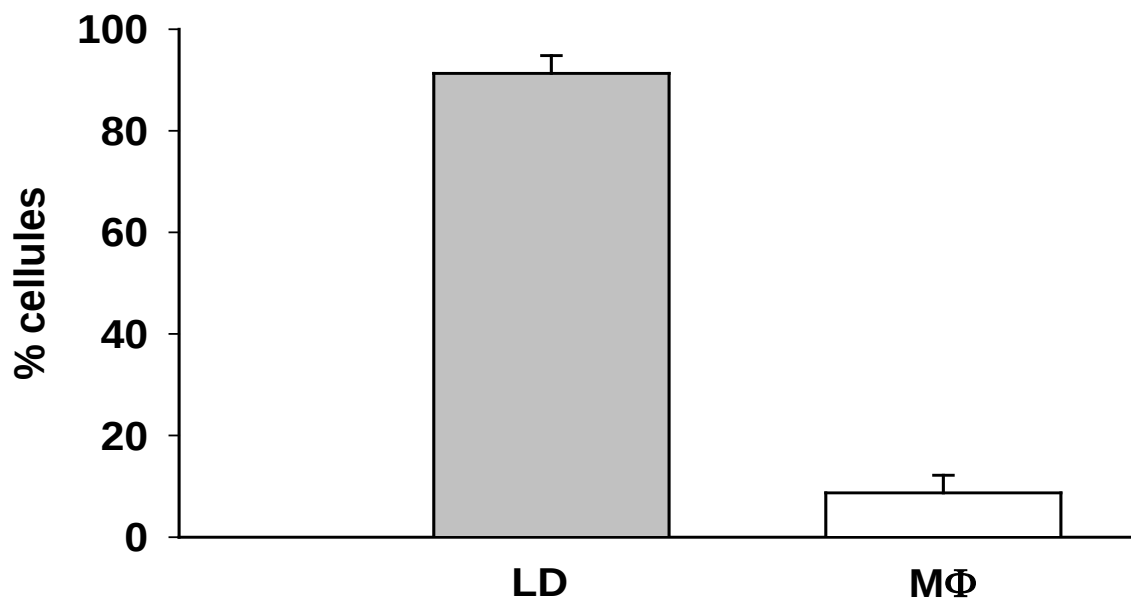


Figure 2 : Composition de la population cellulaire obtenue après 15 jours de culture de cellules de moelle osseuse de souris BALB/c en présence de GM-CSF.

A J₁₅, les cellules sont récupérées par traitement à l'EDTA et déposées sur des lamelles de verre recouvertes de polylysine. Après fixation, les cellules sont soumises à un examen microscopique. Les deux types cellulaires présents dans la population sont distingués par des critères morphologiques. Pour chaque expérience 500 cellules sont comptées (moyennes de 6 expériences $\pm$ 3,9).

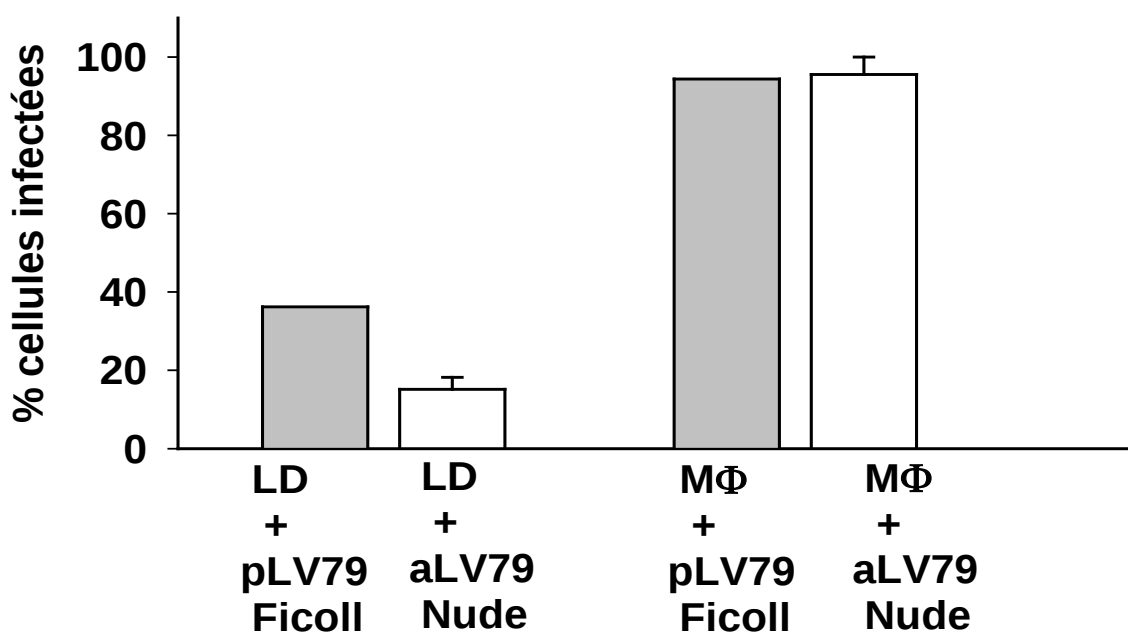


Figure 3 : Pourcentage de leucocytes dendritiques et de macrophages infectés, 24 h après l'addition dans les cultures leucocytaires de promastigotes purifiés sur gradient de Ficoll ou d'amastigotes issus de souris Swiss Nude .

A J₁₄, les cellules sont infectées avec des "promastigotes Ficoll" (pLV79 Ficoll) ou des "amastigotes Nude" (aLV79 Nude) (4 parasites/cellule). vingt-quatre heures après l'infection, les cellules sont décrochées, déposées sur lamelles puis fixées. Pour la détection des parasites intracellulaires, un marquage utilisant l'Ac m 2A3-26 anti-amastigote et le conjugué F(ab')₂ d'Ac d'âne anti-Ig de souris-TR est effectué. Pour chaque expérience, le pourcentage de leucocytes infectés a été déterminé après comptage de 500 cellules.

III. Effet des anticorps associés aux parasites sur l'infection des LD.

Des promastigotes métacycliques ont été purifiés soit, comme dans les expériences précédentes, par centrifugation sur gradients de Ficoll soit par une méthode de sélection négative utilisant l'Ac m 3A1 spécifique d'une molécule de surface des promastigotes, le lipophosphoglycane (LPG), laquelle subit des modifications au cours de la métacyclogenèse. La première méthode permet de purifier des promastigotes métacycliques sur la base de leur faible densité. La seconde méthode repose sur les propriétés de l'Ac m 3A1 qui reconnaît préférentiellement le LPG exprimé par les promastigotes en phase de croissance (non métacycliques) et qui, à certaines concentrations, permet leur agglutination sélective (Courret et al., 1999 ; D. Sacks & E. Saraiva, résultats non publiés). Malgré le fait que l'Ac m 3A1 n'agrége pas les métacycliques, il a été cependant observé qu'il se fixe sur leur membrane plasmique (probablement à cause de l'expression résiduelle de LPG caractéristique des formes parasitaires en croissance à la surface cellulaire des métacycliques, N. Courret et J.-C. Antoine, résultats non publiés).

La figure 4A montre qu'après 24 h de contact avec les parasites un plus fort pourcentage de LD infectés est obtenu lorsque des promastigotes métacycliques purifiés à l'aide de l'Ac m 3A1 sont utilisés comme agents infectieux (environ 36% d'infection avec les "promastigotes Ficoll" contre environ 49% d'infection avec les "promastigotes 3A1"). Cette différence est maintenue après 72 h d'infection. A ce stade, on note cependant une légère diminution des pourcentages de LD infectés dans les deux conditions expérimentales.

Le plus fort pourcentage de LD infectés observé lorsque des "promastigotes 3A1" sont ajoutés aux leucocytes pouvait être dû à la présence d'Ac à la surface des parasites. Des expériences ultérieures utilisant cette fois-ci des amastigotes comme agents infectieux tendent à étayer cette hypothèse. Elles sont décrites ci-après. Des amastigotes ont été purifiés à partir de lésions de souris Nude. Nous avons tout d'abord vérifié par immunofluorescence, en utilisant des Ac anti-Ig et anti- μ de souris, que ces parasites ne présentaient pas d'Ig à leur surface (résultats non montrés). Ces amastigotes ont été placés en présence des LD, tels quels ou après incubation avec un IS de souris BALB/c

infectées par *L. amazonensis* (dans ces dernières conditions, les amastigotes fixent des Ac spécifiques sur leur membrane plasmique ; résultats non montrés).

Les résultats présentés dans la figure 4B montrent que les LD sont beaucoup plus infectés lorsqu'on les incube avec des amastigotes issus de souris Nude puis recouverts d'Ac (environ 41% d'infection dans ces conditions contre environ 16% d'infection lorsque des amastigotes issus de souris Nude non recouverts d'Ac sont utilisés comme agents infectieux). Il apparaît donc que la présence d'Ac à la surface des parasites favorise l'infection. Cette idée est encore confortée par les expériences suivantes.

Des LD ont été mis en contact avec des amastigotes purifiés à partir de lésions de souris Nude ou de souris BALB/c (ces derniers contrairement aux amastigotes issus de souris Nude présentent à leur surface des Ac anti-*Leishmania* d'isotype IgG et IgM. Ceux-ci ont pu être détectés par immunofluorescence après incubation des parasites avec des Ac spécifiques d'Ig de souris). Dans ces conditions, les pourcentages de LD infectés sont respectivement d'environ 10% et 37% (Fig. 4C).

Figure 4 : Pourcentage de leucocytes dendritiques infectés après contact avec des promastigotes métacycliques purifiés par différentes méthodes ou avec des amastigotes issus de lésions de souris Swiss Nude ou BALB/c.

Les LD sont infectés avec soit (A) des "promastigotes Ficoll" (pLV79 Ficoll) ou des "promastigotes 3A1" (pLV79 3A1) , soit (B) des amastigotes issus de lésions de souris Nude et non recouverts d'Ac (aLV79 Nude) ou recouverts d'Ac (aLV79 Nude+IS anti-*Leishmania*), soit (C) des amastigotes issus de lésions de souris Nude (aLV79 Nude) ou BALB/c (aLV79 BALB/c). Vingt-quatre heures ou 72 h après l'addition des parasites, les cellules sont récupérées et fixées comme décrit dans la figure 1 et la détection des parasites intracellulaires effectuée comme décrit dans la figure 2. Pour chaque expérience, le pourcentage de LD infectés a été déterminé après comptage de 500 cellules.

IV. Etude du phénotype des LD infectés avec des promastigotes ou des amastigotes recouverts ou non d'anticorps.

A) Analyse microscopique.

Afin d'apprécier le degré de maturité atteint par les LD infectés depuis 24 h par des leishmanies, une étude de l'expression de la molécule co-stimulatrice B7-2 (CD80) a été entreprise. On sait que cette molécule est surexprimée par les LD matures.

Pour ce faire, des LD ont été infectés avec des promastigotes ou des amastigotes puis, après 24 h, déposés sur lamelles, fixés et incubés avec un Ac m anti-B7-2 et un conjugué fluorescent adéquat. L'expression de B7-2 à la surface des leucocytes a été examinée à l'aide d'un microscope à fluorescence.

Comme témoins d'expression basale et comme témoins positifs, des LD non stimulés et des LD infectés depuis 24 h avec la souche BCG de *Mycobacterium bovis*, cultivés en parallèle avec les LD infectés par *Leishmania* ont été préparés. Les résultats sont présentés dans la figure 5. L'examen des témoins montre qu'en l'absence d'infection, très peu de LD expriment des quantités de B7-2 décelables par cette technique (Fig. 5A). Par contre, comme attendu, l'incubation des LD avec le BCG, qui est connu pour induire une maturation des cellules, entraîne une forte expression de B7-2 (93% de LD positifs) (Fig. 5A).

Pour ce qui est des infections avec *Leishmania*, il est intéressant de remarquer que les LD infectés depuis 24 h avec des parasites non recouverts d'Ac ("promastigotes Ficoll", amastigotes issus de souris Nude) n'expriment pas ou que très peu de B7-2 (Fig. 5B-D), alors que ceux infectés depuis 24 h avec des parasites recouverts d'Ig ("promastigotes 3A1", amastigotes issus de souris Nude puis incubés avec un immunosérum de souris anti-*Leishmania*, amastigotes issus de souris BALB/c) expriment fortement B7-2 (Fig. 5B-D). Ce dernier résultat vaut également pour les LD non infectés (NI dans Fig. 5B-D) présents dans les cultures leucocytaires mis en présence de parasites associés à des Ac spécifiques.

Il est également intéressant de souligner que quelles que soient les conditions expérimentales, les MΦ n'expriment pas de quantités détectables de B7-2 (résultats non montrés).

Une étude de l'expression de B7-2 par les LD infectés depuis 72 h a également été tentée mais n'a pas donné de résultats concluants car dans ces conditions on observe une augmentation importante des cellules B7-2⁺ même dans la population non stimulée du fait, probablement, d'un sevrage des cellules en GM-CSF (une condition qui a été décrite comme induisant la maturation des LD) (Fig. 5B, encart).

La figure 6 illustre certains des résultats décrits ci-dessus à savoir la forte expression de B7-2 par les LD infectés avec le BCG (Fig. 6A) ou avec des "promastigotes 3A1" (Fig. 6E) et le faible marquage observé sur les LD infectés avec des "promastigotes Ficoll" (Fig. 6B) ou avec des amastigotes issus de Nude (Fig. 6C).

La faible fluorescence observée sur ces dernières cellules a une intensité voisine de celle associée à des LD infectés avec des "promastigotes 3A1" et incubés avec un isotype contrôle à la place de l'Ac m anti-B7-2 (Fig. 6D). Elle est donc vraisemblablement due à une fixation non spécifique des Ac.

24 h d'infection

24 h d'infection

24 h d'infection

Figure 5 : Pourcentage de leucocytes dendritiques exprimant B7-2 dans les cultures leucocytaires non infectées (A, groupe NS) ou infectées avec la souche BCG de *Mycobacterium bovis* (A, groupe BCG), des "promastigotes Ficoll" (B, groupe pLV79 Ficoll), des "promastigotes 3A1" (B, groupe pLV79 3A1), des amastigotes issus de Nude et non recouverts d'Ac (C, D, groupe aLV79 Nude) ou recouverts d'Ac (C, groupe aLV79 Nude+IS anti-*Leishmania*), ou des amastigotes issus de souris BALB/c (D, groupe aLV79 BALB/c).

Vingt-quatre heures ou 72 h après addition des micro-organismes, les cellules sont récupérées et fixées comme décrit dans la figure 1. Les cellules ont été examinées après marquage des parasites intracellulaires et de B7-2 avec respectivement l'Ac m 2A3-26 et l'Ac m GL-1-biotinylé et les conjugués fluorescents appropriés. Pour chaque expérience, le pourcentage de LD exprimant B7-2 a été déterminé après comptage de 500 cellules. Dans les populations leucocytaires mises en contact avec des leishmanies, nous avons distingué les LD non infectés (NI) et infectés (I) .

Sur la base des observations précédentes on peut avancer l'idée que les parasites recouverts d'Ac induisent en 24 h une maturation des LD et que les Ac sont nécessaires pour cette induction. L'étude de la distribution des molécules de classe II du CMH (classe II classiques et molécules H-2M) aboutit à la même conclusion comme le montrent les figures 7 et 8. Ainsi, dans les LD infectés avec des "promastigotes Ficol", les molécules de classe II et les molécules H-2M sont en majorité dans des compartiments intracellulaires répartis dans tout le cytoplasme et elles sont en grande partie colocalisées, une distribution typique des LD immatures [Pierre et al., 1997] (Fig. 7A, B et Fig. 8A, B).

On peut également voir que dans ces cellules les vacuoles qui contiennent les parasites sont à la fois classe II et H-2M positives. Par contre, dans les LD infectés avec des "promastigotes 3A1" une faible colocalisation des molécules de classe II et des molécules H-2M est notée. Dans ces cellules, les molécules de classe II sont en majorité associées à la membrane plasmique alors que les molécules H-2M sont présentes dans des compartiments regroupés au niveau du centre cellulaire, une distribution typique des cellules matures [Pierre et al., 1997] (Fig. 7C, D et Fig. 8C, D).

Les vacuoles qui abritent les parasites sont dépourvues ou contiennent peu de classes II, mais elles sont toujours H-2M positives.

Quelles que soient les conditions expérimentales, les MΦ n'expriment pas ou très peu de molécules de classe II et de molécules H-2M.

B) Analyse par cytométrie en flux.

Dans ces expériences, le degré de maturité des LD infectés avec divers stades parasitaires recouverts ou non d'Ac a été apprécié par cytométrie en flux. Cette technique permet une quantification relative mais précise de molécules membranaires et intracellulaires, et l'analyse peut être effectuée sur un beaucoup plus grand nombre de cellules que par la technique de microscopie à fluorescence.

L'expression à la surface cellulaire des molécules suivantes a été examinée :

- CD11a, une chaîne constitutive de l'intégrine β_2 LFA-1.
- CD11c, une chaîne constitutive de l'intégrine β_2 p150,95/CR4.
- Les molécules de classe II du CMH.
- B7-1 (CD80) et B7-2(CD86), des molécules de costimulation.
- CD40, une molécule impliquée dans l'activation des LT.
- CD54 (ICAM-1), une molécule d'adhésion (ligand de LFA-1 et de Mac-1).

Figure 6: Détection par immunofluorescence de la molécule B7-2 exprimée par des LD infectés depuis 24 h avec le BCG ou avec diverses formes de *Leishmania*.

A J₁₄, les cellules sont infectées avec la souche BCG de *Mycobacterium bovis* (A), avec des "promastigotes Ficoll" (B), avec des amastigotes issus de souris Nude (C) ou avec des "promastigotes 3A1" (D, E). Vingt-quatre heures après l'addition des micro-organismes, les LD sont récupérés et fixés comme indiqué dans la figure 1. Les préparations cellulaires sont ensuite simplement marquées avec la combinaison Ac m GL-1 anti-B7-2 biotinylé puis conjugué streptavidine-Alexa Fluor 488 (A, marquage vert) ou doublement marquées avec les combinaisons suivantes: Ac m GL-1 biotinylé + Ac m 2A3-26 anti-amastigote puis conjugués streptavidine-Alexa Fluor 488 + F(ab')₂ d'Ac d'âne anti-Ig de souris-TR (B, C, E, marquage vert spécifique de B7-2, marquage rouge spécifique des leishmanies). Comme témoins négatifs, des lamelles ont été incubées avec l'isotype contrôle R2a 15 biotinylé à la place de l'Ac m GL-1 (D). Ces images ont été acquises à l'aide d'un microscope Zeiss Axiophot muni d'une caméra CCD Princeton Instruments.

Figure 7. Distribution des molécules de Classe II du CMH dans des leucocytes dendritiques infectés avec des "promastigotes Ficoll " (A, B) ou avec des "promastigotes 3A1" (C, D).

Vingt-quatre heures après l'addition des parasites, les LD sont récupérés et fixés comme indiqué dans la figure 1, puis les molécules de classe II et les parasites sont marqués avec la combinaison de réactifs suivante: Ac m 2G-9 anti-classe II biotinylé + Ac m 2A3-26 anti-amastigote puis conjugués streptavidine-Alexa Fluor 488 + F(ab')₂ d'Ac d'âne anti-Ig de souris-TR. Les photographies A, B d'une part et C, D d'autre part représentent les mêmes champs microscopiques exposés pour la détection des classe II (A, C) et pour la détection des parasites (B, D). (A, B) On note que les classe II sont principalement dans des compartiments intracellulaires des LD non infectés (vésicules) et infectés (vésicules, VP) et que relativement peu de ces molécules sont présentes à la surface cellulaire (flèches). (C, D) Une très forte expression des classes II à la surface cellulaire des LD infectés et non infectés est observée. Il est difficile de dire si les VP contiennent des classes II du fait du marquage intense associé à la membrane plasmique.

Figure 8. Distribution des molécules H2-M dans des leucocytes dendritiques infectés avec "promastigotes Ficoll " (A, B) ou avec des "promastigotes 3A1" (C, D).

Vingt-quatre heures après l'addition des parasites, les LD sont récupérés et fixés comme indiqué dans la figure 1, puis les molécules H2-M et les parasites sont marqués avec la combinaison de réactifs suivante: Ac anti-H2-M et Ac m 2A3-26 anti-amastigote biotinylé puis conjugués F(ab)₂ d'Ac d'âne anti-Ig de lapin-FITC+ streptavidine-TR. Les photographies A, B d'une part et C, D d'autre part représentent les mêmes champs microscopiques exposés pour la détection des molécules H2-M (A, C) et pour la détection des parasites (B, D). (A, B) On note que les molécules H2-M sont localisées dans des compartiments intracellulaires distribués dans tout le cytoplasme des cellules et dans les VP. Les flèches indiquent la présence de MΦ riches en parasites et dépourvus de molécules H2-M. (C, D) Les molécules H2-M sont concentrées dans des vésicules et dans les VP étroitement associées au centre cellulaire.

Les résultats présentés dans la figure 9 montrent que les LD expriment CD11c et que le niveau d'expression de cette molécule reste stable dans les différentes situations expérimentales. D'autres expériences indiquent qu'ils sont CD8 α -/- (résultats non montrés). Les LD ont donc un phénotype myéloïde. L'expression de B7-2, CD40 et CD54 varie considérablement en fonction des conditions d'infection. B7-2 est exprimé très faiblement par les LD en l'absence d'infection ou lorsque les LD sont infectés par des parasites non recouverts d'Ac ("promastigotes Ficoll" ou amastigotes issus de souris Nude).

Il faut cependant préciser bien que cela demande confirmation, qu'en présence de "promastigotes Ficoll" on observe une très légère augmentation de l'expression des molécules de classe II, de B7-2, de CD40 et de CD54 (Fig. 9A). Par contre, les LD infectés avec des parasites recouverts d'Ac ("promastigotes 3A1" ou amastigotes issus de souris BALB/c) expriment fortement B7-2. Une expression de niveau similaire est observée pour les LD infectés avec le BCG. Des résultats similaires ont été obtenus pour CD40 et CD54.

L'expression d'autres molécules a été également étudiée, notamment celle de B7-1 dont les variations en fonction des conditions d'infection suivent celles de l'expression de B7-2 (résultats non montrés). Quant à CD11a, tous les LD l'expriment mais de manière stable dans les différentes conditions expérimentales (résultats non montrés).

C) Caractérisation préliminaire des vacuoles parasitophores.

De nombreux travaux de notre laboratoire ont porté sur la caractérisation, la biogenèse et les propriétés des VP contenant des *Leishmania* dans les M Φ infectés [Antoine et al., 1998]. Par contre, peu d'informations relatives aux phagosomes abritant les parasites dans les LD ont été rapportées jusqu'à présent. Pour des raisons de simplicité, nous garderons le terme de VP pour ces derniers. Quelques données concernant leur composition ont été acquises au cours de mon stage de D.E.A. La plupart de ces données proviennent de l'étude de LD infectés depuis 24 h avec des amastigotes issus de souris Nude.

Dans ces conditions, les analyses effectuées en microscopie à fluorescence conventionnelle et confocale montrent la présence de molécules de classe II et de molécules H-2M dans la membrane délimitant ces organelles (Fig. 10), mais également de molécules connues pour être préférentiellement associées aux compartiments tardifs de la voie d'endocytose comme LAMP-1, la macrosialine, l'Ag MOMA-2 (résultats non montrés).

Dans d'autres expériences, la chaîne invariante Ii, une molécule chaperon des molécules de classe II, et la glycoprotéine lysosomale LAMP-2 ont été mises en évidence dans les VP de LD infectés (E. Prina et al., résultats non publiés).

Toutes les molécules listées ci-dessus sont également présentes dans les VP de MΦ infectés [Antoine et al., 1998]. Les VP ne semblent pas pour autant identiques dans les deux types cellulaires. Ainsi, les VP des LD sont de taille plus petite que celles des MΦ et elles sont souvent individuelles alors qu'elles sont généralement communautaires dans les MΦ infectés avec cette espèce de *Leishmania*. [Antoine et al., 1998].

Discussion

Dans cette étude réalisée *in vitro*, nous avons analysé les conséquences des interactions qui s'établissent entre des LD de souris et les formes promastigote et amastigote de *L. amazonensis*. Un des objectifs du présent travail a été d'apprécier la capacité des LD à internaliser ces différents stades du parasite. Nos résultats indiquent qu'après 24 h de contact, le pourcentage des LD infectés avec des "promastigotes Ficoll" est plus élevé que celui des LD infectés avec des amastigotes issus de souris Nude.

D'après certaines expériences réalisées par d'autres membres du laboratoire, cette différence ne semble pas due à une dégradation plus importante des amastigotes intracellulaires suite à leur internalisation. En effet, lorsque les amastigotes sont tués à l'intérieur des cellules hôtes, on observe des structures de forme et de taille variables marquées par l'Ac m 2A3-26. Le marquage de ces structures perdure pendant plus de 48 h (Antoine, J.-C., résultats non publiés). Aucun marquage similaire n'a été observé sur les LD infectés avec les amastigotes.

Une deuxième hypothèse serait d'expliquer le pourcentage plus élevé d'infection observé avec les promastigotes par la facilité avec laquelle ces formes parasitaires, très mobiles, rentreraient en contact avec les LD. Ceux-ci, dans nos conditions de culture, se multiplient et se différencient sous la forme d'agrégats cellulaires légèrement adhérents, ce qui, à priori, ne favorise pas un contact optimal avec les amastigotes, stade du parasite dépourvu de flagelle fonctionnel. Enfin, des couples ligands-récepteurs différents pourraient être impliqués dans la phagocytose des deux formes parasitaires par les LD.

Cette proposition repose sur le fait que des molécules exprimées en grandes quantités à la surface des promastigotes telles que la leishmanolysine et le LPG ne sont plus exprimées ou subissent des modifications structurales importantes au stade amastigote.

D'autre part, la surface de ces derniers se caractérise par la présence abondante de glycosylinositolphospholipides (GIPLs) et de protéophosphoglycannes (PPG) dont certains sont spécifiques de stade. Ces différentes molécules parasitaires pourraient

interagir directement avec des récepteurs présents à la surface des LD comme le récepteur du mannose ou les intégrines CD11b/CD18 et CD11c/CD18 (Alexander et Russell, 1992). La molécule DEC-205, qui appartient à la famille des récepteurs du mannose (lectines de type C) et qui est exprimée principalement sur les LD, pourrait également lier certains des glycoconjugués parasitaires. D'autres récepteurs des LD comme ceux de la famille TOLL (TLRs :Toll-Like-Receptors) sont capables de reconnaître des molécules ayant des motifs structuraux particuliers présents surtout chez certains micro-organismes. Ces motifs désignés sous le nom de PAMPs pour Pathogen-Associated Molecular Patterns, seraient reconnus comme des signaux de danger à l'origine notamment de réponses immunitaires innées. La fixation de ligands portant de tels motifs (lipoprotéines, endotoxines...) induit chez les LD une cascade d'évènements de signalisation aboutissant à leur maturation. Nos résultats ne sont donc pas en faveur de l'existence de telles molécules à la surface des parasites ou sécrétées par les parasites puisque le contact et l'internalisation d'amastigotes issus de Nude ou de "promastigotes Ficoll" ne provoquent pas de maturation des LD.

Concernant la très légère activation des LD, révélée par l'analyse au FACS, des LD mis en présence de "promastigotes Ficoll", elle pourrait résulter de la dégradation d'une partie des parasites et de la libération de molécules parasitaires capables d'activer les LD. Des expériences sont en cours afin de confirmer ou d'infirmer ces résultats.

La présence d'amastigotes à l'intérieur des LD n'empêche pas la maturation induite soit par le BCG (résultats non montrés) soit par la combinaison de cytokines LPS+INF γ (Bennett et al., 2001) soit par la culture prolongée de LD infectés sans renouvellement de milieu. Dans ce dernier cas, la maturation est indépendante de la présence des *Leishmania* puisque les LD de cultures contrôles non infectées mûrissent également. Un renouvellement régulier du milieu permet d'éviter une maturation précoce des LD, infectés ou non (résultats non montrés), confirmant ainsi l'importance d'un apport continu *in vitro* de GM-CSF dans le maintien du phénotype immature de ces cellules.

Par ailleurs, la maturation des LD infectés ne semblent pas interférer avec l'établissement et la multiplication (résultats non montrés) des *Leishmania* intracellulaires.

Ces résultats sont partiellement différents de ceux trouvés par d'autres groupes qui montrent les uns que seuls les amastigotes sont capables de faire maturer les LD (Von Stebut et al., 1998, 2000), d'autres que les deux stades parasites promastigote et amastigote induisent une maturation des LD (Qi et al., 2001), d'autres encore que les promastigotes ne sont pas aptes à induire la maturation des LD (Jebbari et al., 2001), enfin que les promastigotes induisent la maturation des LD mais sont rapidement dégradés (Konecny et al., 1999). Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer ces différences. Elles sont basées sur les protocoles expérimentaux utilisés dans ces expériences et mettent en avant des différences notamment au niveau soit de l'origine des LD et du mode de préparation de ces cellules soit de l'espèce de *Leishmania* soit du mode d'obtention des différentes formes parasites ainsi qu'à la présence de molécules exogènes à la surface des *Leishmania*.

Au cours de nos expériences une étude préliminaire des compartiments (VP) abritant les *Leishmania* a été réalisée sur les LD ayant internalisé des amastigotes issus de souris Nude. Bien que l'on retrouve globalement les mêmes molécules (classe II, H-2M, LAMP...) dans les VP des LD et des MΦ, leur morphologie est cependant très différente. En effet, comparées aux VP de grande taille qui se développent dans les MΦ, les VP présentes dans les LD restent le plus souvent de petite taille à 24 comme à 72 h après le début de l'infection. Ces VP peuvent contenir 1 à 2 parasites, rarement plus.

Les caractéristiques propres aux VP des LD pourraient être liées à des propriétés intrinsèques de ces cellules dont le trafic vésiculaire ne favoriserait pas le développement de grands compartiments. Il se peut également que l'environnement à l'intérieur des VP modifie le métabolisme des amastigotes qui, par exemple, ne seraient plus capables de sécréter des molécules telles que certaines formes de PPG dont certains auteurs ont montré le rôle joué dans la dilatation de ces compartiments (Peters et al., 1997).

Un autre volet de notre étude a porté sur le rôle de certaines opsonines d'une part, dans la capture des *Leishmania* par les LD et d'autre part, dans l'induction de la maturation de ces cellules. Nos résultats montrent que la présence d'Ac à la surface des parasites, que ce soit des promastigotes ou des amastigotes, favorise l'infection des LD mais induit aussi une maturation très nette des LD. Ceux-ci expriment de nombreux

récepteurs pour la portion Fc des IgG de forte (Fc γ RI) mais aussi de moyenne et faible affinité (Fc γ RII et III). Ces récepteurs sont notamment impliqués dans l'endocytose et la phagocytose de complexes immuns et de particules ou de micro-organismes opsonisés (Regnault et al., 1999; Machy et al., 2000).

Les signaux d'activation transmis par les motifs moléculaires ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) suite à l'agrégation des sous-unités de signalisation induisent la maturation des LD (Regnault et al., 1999) a été bien documentée et se traduit notamment par une redistribution des molécules de classe II intracellulaires vers la membrane plasmique ainsi que par une augmentation de l'expression des molécules CD86 et CD40 à la surface cellulaire. De façon concomitante, les molécules LAMP présentes surtout dans les compartiments tardifs de la voie d'endocytose tels les lysosomes se retrouvent concentrées avec les molécules H-2M près du noyau cellulaire (Pierre et al, 1997 ; Winzler et al., 1997, Regnault et al., 1999 ; Turley et al., 2000 ; Kleijmeer et al, 2001 ; Villadangos et al., 2001).

Ces résultats corrélerent avec les nôtres et indiquent que cette voie de phagocytose des *Leishmania* mettant en jeu des Ac spécifiques et des immunorécepteurs de type Fc pourrait jouer un rôle important dans la propagation de l'infection mais aussi dans le maintien d'une réponse immunitaire anti-leishmanienne. Des études sont en cours dans le laboratoire afin de documenter l'expression/la production par des LD soumises à différentes conditions d'infection 1°) de molécules impliquées dans la migration de ces cellules telles que les récepteurs de chimiokines comme CCR2, CCR4, CCR5 et CCR7, 2°) de chimiokines permettant "l'attraction" d'autres effecteurs cellulaires tels que MIP-1 α et γ , MCP-4 et MDC et 3°) de diverses cytokines pouvant jouer un rôle dans la polarisation de la réponse T telles que l'IL-12, l'IL-10 et l'IL-4. A ce propos, il est important de préciser que la différenciation des LD mis en contact avec des *Leishmania* opsonisées n'est pas restreinte aux seules cellules infectées ce qui pourrait étayer l'hypothèse d'une sécrétion de cytokines telles que l'IL-12 et le TNF- α mais peut-être aussi de l'expression de molécules membranaires comme CD40L, toutes impliquées dans l'auto-amplification des signaux de transduction menant à la maturation des LD.

Les infections naturelles des hôtes mammaliens de *Leishmania* sont initiées par l'inoculation dans le derme d'un très faible nombre de promastigotes métacycliques. L'étude de modèles murins expérimentaux mimant, au moins en partie, les conditions naturelles d'inoculation des parasites montre que, lors d'une primo-infection, l'hôte ne semble pas mettre en place une réponse inflammatoire ou une réponse immunitaire avant plusieurs semaines malgré le fait que la population parasitaire croît pendant cette période (Belkaid et al., 2000). Cela pourrait s'expliquer par le fait que, à ce stade, les parasites ne sont pas internalisés par une phagocytose de type I impliquant des récepteurs tels que les récepteurs Fc, lesquels sont à l'origine de réactions inflammatoires (Caron et Hall, 1998).

Par contre, on peut penser qu'au début de l'infection les parasites sont captés par des cellules phagocytaires via un mécanisme de phagocytose de type II "plus silencieux" et impliquant par exemple des récepteurs de composants du complément (CR1, CR3). De plus, si MΦ et LD sont présents au contact des parasites au moment de l'injection, nos résultats comme ceux de Konecny et al. (1999) laissent supposer que les promastigotes seront préférentiellement captés par les MΦ favorisant ainsi leur établissement dans les premières étapes de l'infection. En effet, en absence de signal d'activation, les MΦ représentent les cellules hôtes idéales pour la prolifération des *Leishmania*. Celles-ci pourraient alors se multiplier jusqu'à une étape seuil où la présence des parasites serait finalement détectée et conduirait à la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique incluant la production d'Ac qui via leur fixation sur les parasites et la maturation des LD que cela entraîne pourraient a) contribuer à amplifier cette réponse et b) favoriser le contrôle de la croissance parasitaire. Dans ce scénario, les Ac anti-*Leishmania* seraient défavorables aux parasites. D'autres scénarios dans lesquels la présence d'Ac serait bénéfique pour les parasites peuvent cependant être proposés au vu de résultats récents obtenus avec des souris déficientes dans la production d'Ig et qui étayaient l'idée que les Ac anti-*Leishmania* favorisent la croissance parasitaire (Kima et al., 2000, Smelt et al., 2000). D'autre part, il a été récemment publié que, dans certaines conditions expérimentales, des amastigotes opsonisés avec des Ac peuvent déclencher chez des MΦ la synthèse d'IL-10, une cytokine connue pour ses propriétés anti-inflammatoires (Kane et Mosser, 2001) et que des MΦ mis en contact avec des complexes Ag-Ac orientent la différenciation de LT CD4 vers une voie Th2 (Anderson

et Mosser, 2002) (rappelons que, chez les souris infectées par *Leishmania*, la sous-population de LT CD4 de phénotype TH2 participe à l'expansion des parasites).

Des expériences sont en cours afin de déterminer si à l'intérieur des LD, les *Leishmania* survivent, sont capables de s'y multiplier et si elles peuvent être à l'origine de complexes classe II – Ag parasitaires fonctionnels. Il serait également intéressant de déterminer si, comme chez les MΦ, les immuncomplexes Ag-Ac et les amastigotes opsonisés avec des Ac provoquent la synthèse d'IL-10 chez les LD.

Les conclusions de notre travail sont pour l'instant limitées aux interactions *Leishmania*-LD de souris dérivés *in vitro* de précurseurs médullaires. Il est bien connu que les LD constituent une famille très hétérogène de cellules ayant des phénotypes et des fonctions caractéristiques. Il est donc possible que l'interaction des leishmanies avec d'autres types de LD aboutisse à des résultats différents.