

## Autorégulation de la croissance *in vitro* des Trypanosomatidae

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

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

### Autocrine regulation of *Trypanosomatidae* *in vitro* growth

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

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

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

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

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

Note présentée par Jean DORST.

30 JAN. 1996

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° : 43714

Cote : B ext.

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

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

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

---

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

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

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

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

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

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

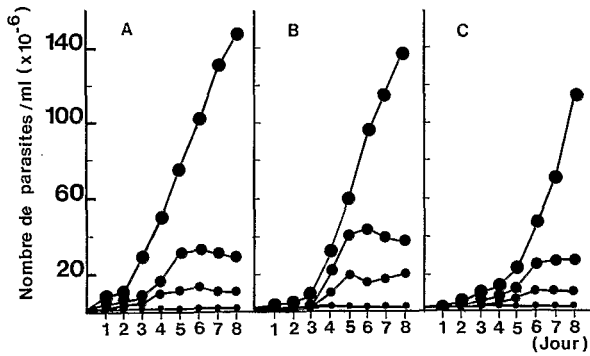


Fig. 1

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

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

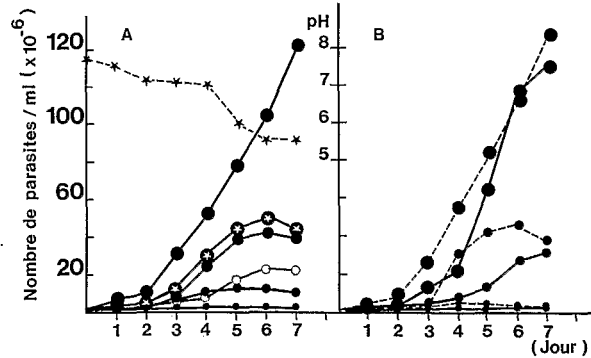


Fig. 2

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

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

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

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

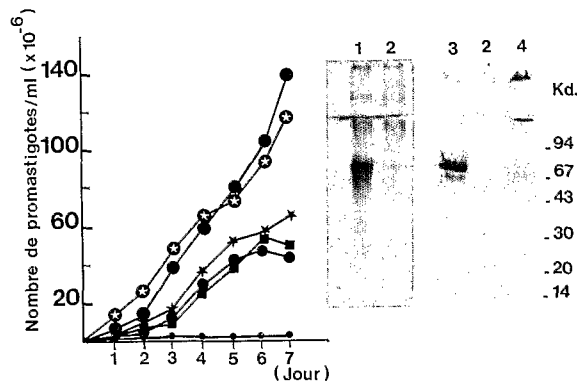


Fig. 3. — Dose-dépendance et caractérisation physico-chimique de l'activité « facteur de croissance ». Effet bifonctionnel sur la croissance de *L. chagasi* des fractions éthanol-insolubles et thermostables préparées à partir de surnageants LITR9 de phase exponentielle (●—●) et de phase stationnaire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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Note reçue et acceptée le 7 mars 1988.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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

J.-L. L., F. R., F. S., M. L. et A. C. : Centre d'Immunologie et de Biologie parasitaire,  
Unité mixte I.N.S.E.R.M. U 167-C.N.R.S. 624,  
Institut Pasteur, 1, rue du Professeur-Calmette, 59019 Lille Cedex:

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

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